

**Aus der Klinik Gynäkologie, gynäkologische Endokrinologie und Onkologie**

Direktor: Prof. Dr. med. U. Wagner

des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg



## **Untersuchung inflammatorischer Immunzellsubsets im Aszites von Ovarialkarzinom - Patientinnen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung

des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Philipp Immanuel Schimanowski

aus Wuppertal

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 16.02.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. U. Wagner

Erster Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Lohoff

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Ovarialkarzinom .....	1
1.1.1	Überblick.....	1
1.1.2	Epidemiologie.....	1
1.1.3	Ätiologie.....	1
1.1.4	Histologie.....	2
1.1.5	Pathogenese .....	2
1.1.6	Klassifikation.....	4
1.1.7	Therapie .....	5
1.1.8	Prognose .....	7
1.2	Das Immunsystem beim Ovarialkarzinom.....	9
1.2.1	Das Tumormikromilieu .....	9
1.2.2	Tumor und Inflammation.....	12
1.2.3	TH17-Zellen .....	13
1.2.4	Protumorigene Funktionen von TH17-Zellen .....	14
1.2.5	Antitumorigene Funktionen von TH17-Zellen .....	15
1.2.6	regulatorische T-Zellen (Tregs).....	17
1.2.7	myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) .....	19
1.2.8	Tumor assoziierte Makrophagen.....	20
1.3	Fragestellung.....	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>24</b>
2.1	Laborgeräte .....	24
2.2	Software .....	25
2.3	Kits.....	25

2.4	Verbrauchsmaterial.....	26
2.5	Antikörper und Microbeads.....	26
2.6	Puffer, Lösungen und sonstige Chemikalien.....	28
2.7	Patientenkollektiv.....	29
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>31</b>
3.1	Übersicht über das Probenprozessing.....	31
3.2	Isolierung von mononukleären Zellen aus Aszites und peripherem Blut mittels Ficollgradient.....	32
3.3	Magnetische Zellseparation (MACS) CD14+ Monozyten bzw. Makrophagen.....	35
3.4	Phenotyping Tumor assoziierter Makrophagen aus Aszites bzw. peripherer Monozyten.....	36
3.5	Quantifizierung von MDSCs im Aszites und peripherem Blut .....	37
3.6	Quantifizierung und Charakterisierung von Tregs im Aszites und peripherem Blut.....	38
3.6.1	Bestimmung CD4+CD25+FoxP3+ Tregs .....	38
3.6.2	MACS Selektion CD4+CD25+CD127dim/- Tregs.....	39
3.7	CFSE-Treg-Suppressionsassay .....	40
3.8	Bestimmung von TH17-Zellen und Effektor T-Zellen im Aszites und peripherem Blut .....	42
3.9	Durchflusszytometrische Analyse .....	44
3.9.1	Theoretische Grundlagen .....	44
3.9.2	Geräteeinstellung, Messung und Auswertung.....	45
3.9.3	Treg Phänotypisierung.....	45
3.9.4	TH17 Phänotypisierung .....	46
3.9.5	CFSE Proliferationsassay .....	48
3.9.6	TAM Phänotypisierung und MDSCs.....	51
3.10	Statistik.....	51

<b>4</b>	<b>ERGEBNISTEIL .....</b>	<b>52</b>
4.1	Charakterisierung und Subgruppenanalyse von TH17-Zellen .....	52
4.2	Klinische Response bei TH17-Zellen.....	54
4.3	Assoziationen zwischen TH17-Zellen und TAM-Polarisierungsmarkern ...	55
4.4	Analyse von Effektor T-Zellen im Aszites und peripherem Blut.....	57
4.5	korrelative TH17- und Effektor-T-Zell Untersuchung.....	59
4.6	Assoziationen zwischen TAM-Polarisierungsmarkern und Effektor-T-Zellen 61	
4.7	Auswirkung von Effektor T-Zellen auf das RFS (relapse free survival) .....	63
4.8	Treg Effekte auf TH17- und Effektor-T-Zellen .....	64
4.9	TH17-Zellen im Zusammenhang mit MDSCs.....	66
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
5.1	Der prognostische Wert von TH17-Zellen .....	68
5.2	Korrelation zwischen TAM-Phänotyp und der TH17 Polarisation.....	70
5.3	TH17- und immunsuppressive Immunzellen im Kontext der Tumorgenese 72	
5.4	Effektor-T-Zellen und ihre Rolle als Prognosefaktor .....	74
5.5	TH17- und Effektor T-Zellen im Kontext der Tumorgenese .....	77
5.6	Korrelation zwischen TAM-Phänotyp und Effektor-T-Zellen.....	79
5.7	Kritik der Methodik .....	81
5.8	Fazit und Ausblick .....	82
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>97</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	97

9.2	Tabellenverzeichnis.....	98
9.3	Abkürzungsverzeichnis.....	98
9.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	100
9.5	Danksagung .....	101

## **1 EINLEITUNG**

### **1.1 DAS OVARIALKARZINOM**

#### **1.1.1 Überblick**

Das Ovarialkarzinom ist eine maligne Tumorerkrankung bei Frauen, die meist nach der Menopause auftritt. Über viele Jahre konnte trotz intensiver Forschungsbemühungen die Prognose nicht wesentlich verbessert werden. Das liegt unter anderem an der schweren Früherkennung, da das Ovarialkarzinom sich im Bauchraum lange entwickeln kann, ohne Symptome zu verursachen. Dadurch befinden sich bei der Erstdiagnose bereits viele Karzinome im fortgeschrittenen Stadium und sind somit oft nicht mehr total resezierbar. Darüber hinaus kann zwar eine Chemotherapie die Heilungschancen verbessern, die Rezidivwahrscheinlichkeit bleibt aber trotzdem relativ hoch.

#### **1.1.2 Epidemiologie**

Mit einer Morbidität von 18,6/100.000 ist das Ovarialkarzinom die sechsthäufigste Krebserkrankung bei Frauen. In Deutschland erkrankten laut Robert Koch Institut 2008 7790 Frauen, 5529 verstarben an einem malignen Tumor des Ovars. Trotz rückläufiger Inzidenz seit den 90er Jahren ist die Mortalität nur leicht gesunken. Grundsätzlich kann die Erkrankung in jedem Lebensalter auftreten, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 69 Jahren liegt. Mit zunehmendem Alter steigt auch das Risiko zu erkranken bis zum Alter von 75 Jahren kontinuierlich an und stagniert dann, vermutlich im Zusammenhang mit der Menopause. Da 59% der Tumore erst im Stadium T3 (s.u.) diagnostiziert werden, ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate mit 40% vergleichsweise gering (Robert-Koch-Institut, Krebs in Deutschland 2007-2008; 2012).

#### **1.1.3 Ätiologie**

Die genaue Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist noch weitestgehend ungeklärt. Es besteht zu 10% eine familiäre Disposition meist in Form von Mutationen auf dem Genloki BRCA1- und BRCA2-, die auch mit dem Mammakarzinom in Verbindung

## Einleitung

stehen, sodass dieses auch für ein Ovarialkarzinom prädestiniert. Eine Reihe von weiteren Risikofaktoren sind:

- Infertilität
- Alter
- kaukasische Rasse
- Nulliparität
- Rauchen

### 1.1.4 Histologie

Grundsätzlich können Ovarialkarzinome aus dem einfach kubischen Epithel, dem Stroma ovarii und dem darin enthaltenem Keimgewebe entstehen. Am häufigsten sind epitheliale Tumore. Da die Ovarialkarzinome sehr heterogen sind, werden sie nach ihrem Epitheltyp weiter unterteilt in:

- serös
- muzinös
- endometroid
- klarzellig
- transitionalzellig (Brenner-Tumoren)

Das seröse Ovarialkarzinom kommt mit >50% am häufigsten vor (Kommoss et al. 2009). In dieser Arbeit wurden ausschließlich Patientinnen mit einem *high grade* serösen Ovarialkarzinom untersucht.

### 1.1.5 Pathogenese

Allgemein werden derzeit drei Gewebe als Ursprungsort für die Tumore diskutiert: Das Oberflächenepithel der Ovarien, das Tubenepithel und das sekundäre Müllerepithel, welches als Relikt aus der Embryogenese angesehen wird. Hinsichtlich der Theorien zum Ursprung des Ovarialkarzinoms findet aktuell ein Paradigmen-Shift statt. Nach klassischem Verständnis entsteht das Ovarialkarzinom aus dem Oberflächenepithel des Ovars. Dafür spricht, dass das Epithel bei jeder Ovulation geschädigt wird und somit ständig Reparaturprozessen unterliegt, was eine maligne Entartung begünstigt und



## Einleitung

auch „*incessant-ovulation-theory*“ genannt wird (Fathalla MF 1971). Beobachtungen, dass Ovulationshemmer das Erkrankungsrisiko senken und eine hohe ovarielle Aktivität dieses verstärkt, bekräftigt ebenfalls die Annahme vom Oberflächenepithel als Ursprung (Auersperg et al. 1997).

Andere Autoren machen primär hohe Gonadotropin-Level für eine maligne Entartung verantwortlich, was erklären würde, warum der Großteil der Karzinome postmenopausal auftritt und Frauen mit wenig Ovulationen und somit geringem Gonadotropin-Spiegel seltener erkranken (Cramer et Welch 1983).

In ihren Untersuchungen konnten die Arbeitsgruppen von Orsulic et al. (2002) sowie Flesken-Nikitin et al. (2003) zeigen, dass bei Mäusen Karzinome aus dem Oberflächenepithel entstehen, wenn bestimmte Tumorsuppressorgene (u.a. P53) ausgeschaltet werden. Allerdings weisen Ovarialkarzinoms häufig zystischen Anteile auf, die auf keinen epithelialen Ursprung hinweisen. Es wird darüber hinaus vermutet, dass das Tubenepithel an der Tumor Entstehung zumindest beteiligt ist (Leeper et al. 2002).

Die häufige Koinzidenz der Tumore macht auch eine Entstehung aus Zellen des sekundären Müller Systems denkbar. Für diese Erklärung spricht, dass gerade Borderline-Tumore bilateral und ohne epitheliale Beteiligung auftreten können (Wang et al. 2003). Auch späte Rezidive, die wie ein neuer Tumor auf Chemotherapie reagieren, weisen auf einen multizentrischen Ursprung hin (Markmann et al. 1991). Diese Beobachtungen werden in der Literatur auch als „*field effect*“ (Woodruff et al. 1969) oder „*field cancerization*“ (Buller et al. 1998) bezeichnet.

Auf diese Erkenntnisse gründen sich zwei neuere Hypothesen zur Pathogenese des Ovarialkarzinoms (Dubeau et al. 2008):

Die Zölum Hypothese geht davon aus, dass Zellen, die dem Zölum-Epithel entstammen, sich zu Müller-ähnlichen Zellen differenzieren. Dies geschieht vornehmlich in hormonreichen Bereichen, in denen Inklusionzysten entstehen. In einem weiteren Schritt entarten diese Zellen und es entsteht ein Tumor, was allerdings bedeuten würde, dass die Tumorzellen zunächst besser differenziert wären als die Stammzellen.

## Einleitung

Dem Ansatz der Müller-Hypothese nach entarten die Zellen des Zölum-Epithels ohne einen solchen Differenzierungsschritt. Das Phänomen multizentrischer Karzinome wird von beiden Theorien erklärt, eindeutige Erkenntnisse gibt es bislang allerdings nicht.

### 1.1.6 Klassifikation

Aktuell werden die Ovarialkarzinome nach einem neueren Modell in Typ I und Typ II eingeteilt:

90% der Karzinome sind vom Typ I oder high-grade-Subtyp und leiten sich *de novo* von ovariellen oder endometroiden Epithel ab. Der Subtyp weist eine Mutation im p53 Suppressor-Gen, eine hohe genetische Instabilität und ein aggressives Wachstum auf. High-grade Karzinome sprechen gut auf Chemotherapie an (Kurman et al. 2008).

Die Typ II oder low-grade-Subtyp Karzinome entstehen durch verschiedene Mutationen. Beteiligte Gene sind K-ras, B-raf, P-ten und beta-Catenin. Der Tumor ist klinisch indolent und entspricht einem mikropapillären, serösen low-grade-Karzinom vom Borderline Typ. Es erkranken meist jüngere Frauen und die Prognose ist trotz geringerer Chemosensibilität besser (Gilks 2004). Manche Autoren zählen auch die muzinösen-, endometroiden-, transitionalen- und klarzell-Tumore dazu (Shih et al. 2004).

Neben der histologischen Typisierung mit einer Einteilung in high-grade und low-grade Karzinome geschieht die Einteilung der Krankheitsstadien postoperativ unter Einbeziehung klinischer und pathologisch-anatomischer Befunde gemäß der FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) Klassifikation, die sich allgemein an der Ausdehnung und Lokalisation der Befunde orientiert (Tabelle 1.1.).

<b>FIGO</b>	<b>TNM<sup>1</sup></b>	<b>OVAR</b>
<b>I</b>	<b>T1</b>	<b>Begrenzt auf Ovarien</b>
Ia	T1a	Ein Ovar, Kapsel intakt
Ib	T1b	Beide Ovarien, Kapsel intakt
Ic	T1c	Kapselruptur, Tumor auf Ovaroberfläche, positiver Aszites oder Peritonealspülung
<b>II</b>	<b>T2</b>	<b>Ausbreitung im Becken</b>
IIa	T2a	Auf Uterus oder Tube(n)
IIb	T2b	Andere Beckengewebe
IIc	T2c	(2a oder 2b) und positiver Aszites oder Peritonealspülung
<b>III</b>	<b>T3 und/oder N1</b>	<b>Peritonealmetastasen und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen</b>
IIIa	T3a	Mikroskopische Peritonealmetastasen
IIIb	T3b	Makroskopische Peritonealmetastasen ≤2cm
IIIc	T3c und/oder N1	Peritonealmetastasen ≥2 cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>IV</b>	<b>M1</b>	<b>Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)</b>

**Tabelle 1.1** FIGO- und TNM-Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms (Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. 2012)

### 1.1.7 Therapie

Therapie der Wahl ist zunächst die radikale Operation mit Exzision aller Tumormanifestationsorte im Abdomen („Tumorebulking“) und anschließende Kombinationschemotherapie, außer bei Patientinnen mit frühem Ovarialkarzinom Stadium IA Grad 1 (Leitlinie der Kommission Ovar 2007).

Sofern kein Kinderwunsch bei der Patientin besteht, werden eine Adnektomie, eine Hysterektomie und eine infrakolische Omentektomie durchgeführt. Dabei wird der längliche Hautschnitt über dem Bauch großzügig gezogen, um die gesamte Abdominalhöhle ausführlich auf einen Tumorbefall hin zu überprüfen. Bei positivem

## Einleitung

Befund wird das Organ teilresiziert (Leber, Blase, Colon) oder auch komplett entfernt (Milz, Appendix). Selbst in frühen Stadien ist die systematische pelvine und paraaortale Lymphonodektomie sinnvoll. Multiple Peritonealbiopsien, auch aus unauffälligen Regionen, werden empfohlen.

Dieses radikale Vorgehen erklärt sich einerseits durch die verbesserte Prognose und zum anderen durch das vermehrte Ansprechen auf die folgende adjuvante Chemotherapie. In beiden Fällen ist der bestimmende Faktor die Größe des verbleibenden Tumors.

Die Chemotherapie wird außer im Stadium IA Grad 1 durchgeführt, da bereits mit Rezidiven zu rechnen ist, denn der Tumor manifestiert sich per definitionem außerhalb der Kapsel des Ovars.

Bei makroskopischer Tumorfreiheit in der Op verfolgt eine Chemotherapie den kurativen Ansatz und dauert in etwa ein halbes Jahr. Behandelt wird in 3-6 Zyklen mit platinbasierten Präparaten wie Cysplatin oder dem nebenwirkungsärmeren Carboplatin (Vergote et al. 1992), kombiniert mit Paclitaxel.

Der Tumormarker CA 12-5 (Mucin 16 auf >80% der Ovarialkarzinome exprimiert) dient der Kontrolle und ist besonders bei fortgeschrittenen Stadien sehr sensitiv. Da er aber auch bei anderen Erkrankungen erhöht sein kann, wird er in der Frühdiagnostik außerhalb klinischer Studien nicht eingesetzt. Nach drei Zyklen sollte CA 12-5 um ca. 50% gefallen sein, wenn der Tumor sensibel auf das Chemotherapeutikum reagiert (Lee et al. 2009).

Meistens wird die Strahlentherapie nur noch palliativ, beispielsweise zur Behandlung von Knochenmetastasen, eingesetzt. Für molekularbiologische Ansätze konnte bislang noch kein Vorteil gegenüber der klassischen Chemotherapie nachgewiesen werden. Allerdings ist die Angiogenesehemmung mit dem Antikörper Bevacizumab für fortgeschrittene Stadien bereits Teil der Primärtherapie.

## Einleitung

### 1.1.8 Prognose

Mit dem Staging kann sich intraoperativ auch die Prognose verschlechtern (bei 20-30% der Patientinnen im Stadium I,II), je mehr der Tumor metastasiert und je größer der verbleibende Tumorrest ist. Bei makroskopischer Tumorfreiheit betragen die Heilungschancen 60%, verbleibt ein 1cm großer Rest, sinken sie schon auf 10%.

Einen Überblick über die 5-Jahres-Überlebensraten bietet folgende Tabelle:

FIGO	5-Jahres-Überlebensrate
I	80 – 90%
II	40 – 60%
III	10 - 40%
IV	<10 %

**Tabelle 1.2. 5-Jahres Überlebensrate beim Ovarialkarzinom**

Ein weiteres Kriterium ist in Folge das Ansprechen auf die Chemotherapie. Bei einer primären Progression oder einem Frührezidiv ist ein kurativer Therapieansatz schon nicht mehr sinnvoll. Weitere prognosebestimmende Kriterien sind das pathologische Grading und der Epitheltyp des Tumors.

Da die meisten Ovarialkarzinome erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden und die Prognose demzufolge schlecht ist, wird momentan intensiv nach serologischen Tumormarkern geforscht, die eine bessere Früherkennung ermöglichen. Für die klinische Nachbeobachtung wird in den Leitlinien zurzeit bei symptomfreien Patientinnen nur die regelmäßige körperliche Untersuchung empfohlen. Die Bestimmung des Tumormarkers CA125 führt nicht zu einer Verlängerung des Überlebens und ist somit nicht Teil der Routinediagnostik.

Gegenstand aktueller Forschungen sind neben vielen anderen Parametern vor allem das humane epididymale Protein 4 (HE4) (Moore et al. 2009) sowie glycosilierte Akut-

## Einleitung

Phase Proteine und IgG (Saldova et al. 2007). In der Diagnose von Ovarialkarzinom-Rezidiven zeigt HE4 im Vergleich zu 5-Jahres Überlebensrate beim Ovarialkarzinom CA125 eine höhere Sensitivität und Spezifität (vgl. Piovano et al. 2014). Die vielversprechenden Ergebnisse müssen allerdings noch unter randomisierten Bedingungen mit größeren Fallzahlen verifiziert werden. Fortschritte im Bereich der Proteomik eröffnen die Möglichkeit, in kurzer Zeit viele Biomarker gleichzeitig zu bestimmen. Daraus können in Kombination Algorithmen entwickelt werden, die eine verbesserte Prognosebestimmung ermöglichen (Cohen et al. 2014).

Biomarker könnten darüber hinaus auch Hinweise hinsichtlich der Prognose der einzelnen Tumorformen geben und bei der Einteilung in Typ-I und Typ-II Karzinome helfen (Nolen et al. 2009).

Neuere Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass die Verteilung bestimmter Immunzellen einen großen Unterschied im Outcome macht. In einer Studie erhöhte eine hohe Zahl an intraepithelialen CD8+ T-Zellen bei Patientinnen das Überleben deutlich von 26 auf 55 Monate. Eine hohe Ratio aus CD8+-T-Zellen/T-regs verbesserte das Überleben sogar auf 58 Monate im Vergleich zu 23 Monaten bei Patientinnen mit niedrigen Ratios. CD4+ T-Zellen, aus denen auch regulatorische T-Zellen (Tregs) entstehen, wurden ebenfalls als beteiligte Population identifiziert: Ein hohes CD8+ T-Zell/CD4+ T-Zell Ratio im epitheliale Ovarialkarzinom erhöhte bei 117 Fällen das mediane Überleben von 25 auf 74 Monate (Sato et al. 2005).

In einer weiteren Studie konnten die tumorprogressionsfreien Intervalle mit der Präsenz von Ovarialkarzinom infiltrierenden T-Zellen positiv korreliert werden (Zhang L et al. 2003).

Diese Ergebnisse werden auch von anderen Studien bestätigt, sodass eine Aufklärung der Zusammenhänge in Zukunft zu einer Verbesserung der Diagnosen und zu neuen Therapiemöglichkeiten führen wird.

### 1.2 DAS IMMUNSYSTEM BEIM OVARIALKARZINOM

#### 1.2.1 Das Tumormikromilieu

Tumore haben ein sehr heterogenes Mikromilieu, das sich stark vom physiologischen Milieu des Körpers unterscheidet. Durch unkontrolliertes Wachstum entsteht ein ungeordnetes Stroma mit abnormer Vaskularisation und dadurch vor allem zentral hypoxischen Bereichen. Auch die Versorgung mit Nährstoffen wie Kohlenhydraten und Zucker erfolgt unkoordiniert, was zu Azidose führt (Mueller-Klieser 2010).

Neben Molekülen, die Tumorwachstum und –vaskularisation ermöglichen, ist auch die Zusammensetzung von Signalmolekülen, die das Immunsystem beeinflussen, verändert. Dazu gehören Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Prostaglandine. Über viele Tumor-escape-Mechanismen wird eine adäquate Immunantwort verhindert, sodass die Karzinome ungehindert wachsen können. Einige Mechanismen sind typisch für das Ovarialkarzinom.

Das Ovarialkarzinom entsteht im Gegensatz zu beispielsweise hämatologischen Karzinomen ausschließlich in einem äußerst immunsuppressiven Milieu in der Peritonealhöhle, was auch entscheidend für die häufig diffuse lokale Metastasierung und für die Rezidive ist.

Um eine überschießende Reaktion des Immunsystems, wie sie bei Autoimmunkrankheiten erfolgt, zu verhindern, werden die Prozesse über Signalmoleküle von TH17-Zellen (T-helper 17 Zellen) und T-regs reguliert (Yigit et al. 2010). Alle Zellen des Immunsystems können grundsätzlich pro- und antitumorigen wirken, allerdings ist dieses Gleichgewicht beim Ovarialkarzinom zugunsten protumorigener Effekte gestört und das Vorkommen sowie die funktionellen Eigenschaften der Komponenten im Tumormilieu des Ovars unterscheiden sich bei erkrankten Patientinnen wesentlich von denen gesunder Frauen.

Speziell für das Ovarialkarzinom wurden bereits einige Zusammenhänge aufgedeckt, die beim Immunoediting beteiligt sind. Tumor-, aber auch Stroma- und Immunzellen selbst sezernieren vermehrt immunsuppressive Faktoren. Proliferation, Aktivierung

## Einleitung

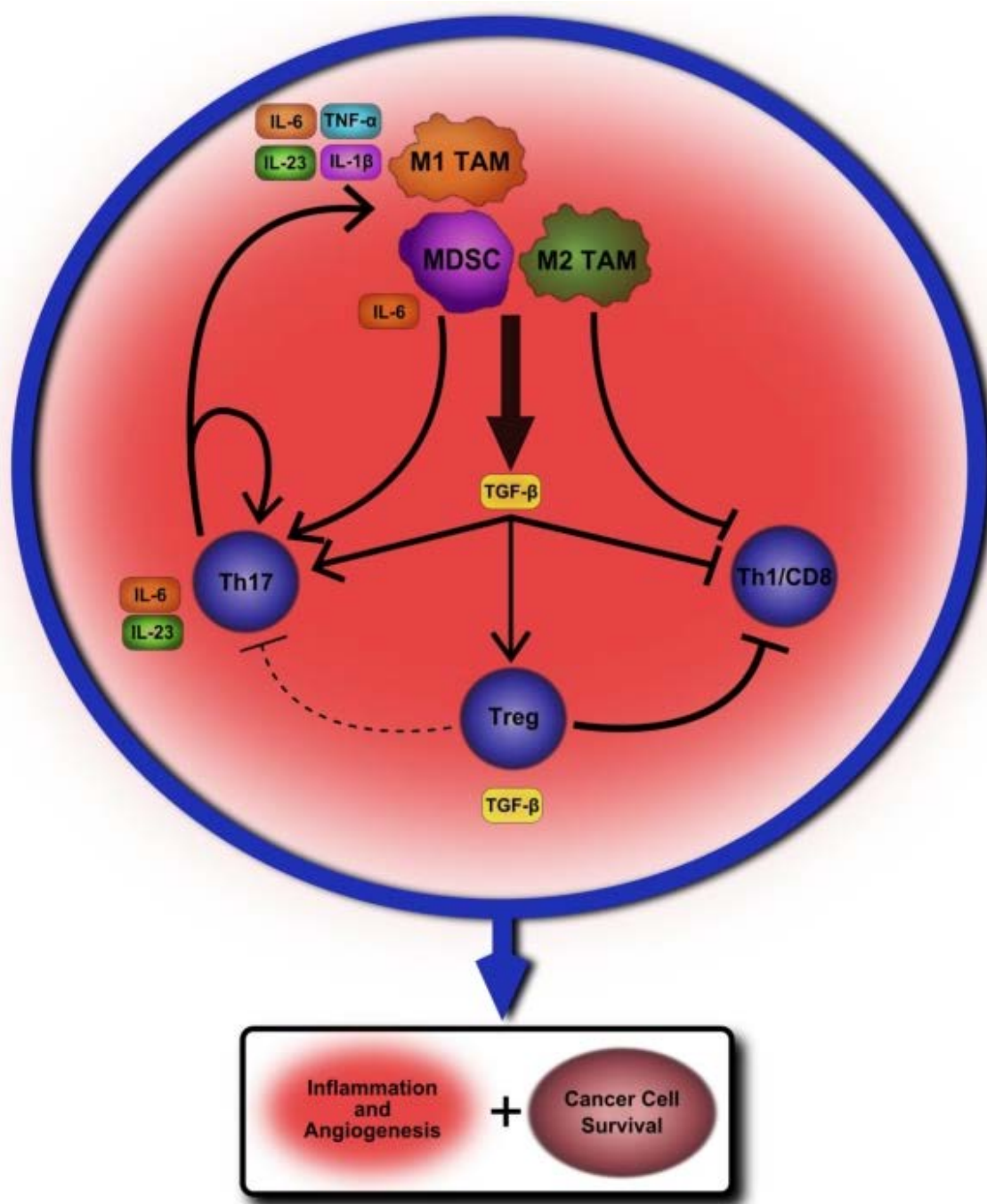
und Differenzierung des Immunsystems werden dadurch beeinflusst und die antitumorogene Immunantwort wird gehemmt (Yigit et al. 2010).

Die Tumorzellen beim Ovarialkarzinom entsprechen nicht einem homogenen Zelltyp. Es können allgemein zwei Subpopulationen von Ovarialkarzinom-Zellen mit unterschiedlichem Stammzellpotential, inflammations- und Zytokin-Profil in Typ1 und Typ2 eingeteilt werden. Typ1-Zellen induzieren, durch Tumor assoziierte Makrophagen (TAM) vermittelt, Reparatur- und Erneuerungsmechanismen. Sie exprimieren dazu vermehrt scavenger Rezeptoren und Zytokine wie IL-6 und IL-8. Typ2-Zellen dagegen haben keine Stammzell-Eigenschaften und kreieren ein immuntolerantes Tumormikromilieu, indem sie Makrophagen zur IL-10 Produktion anregen und die Differenzierung von Tregs fördern (Alvero et al. 2012).

Durch Mutationen kann bei Tumorzellen die Präsentation von Antigenen reduziert sein, sodass die Tumorzellen von T-Zellen nicht mehr als fremdartig erkannt werden (Quesnel 2008). Auch eine Heterogenität der präsentierten Antigene verhindert eine koordinierte Immunantwort (Hicklin et al. 1999; Garrido et al. 1997).

Ein weiterer Tumor-escape-Mechanismus beim Ovarialkarzinom sind gestörte Signalwege, die das Zuführen entarteter Zellen in die Apoptose verhindern können (Igney et Krammer 2002). Einen Überblick über die verschiedenen Zellen im Tumormikromilieu gibt die Abbildung 1.1.





**Abbildung 1.1 Schematische Übersicht des Tumormikromilieus** Das Tumormikromilieu zeichnet sich durch eine chronische Inflammation aus, die durch Tumorzellen und die verschiedenen Immunzellen aufrecht erhalten wird. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) und M2-TAMs modulieren durch die Zytokine IL-6 und TGF- $\beta$  das Mikromilieu, indem sie Effektor-T-Zellen supprimieren und die Entwicklung von Tregs und TH17-Zellen induzieren. Schlüsselmoleküle der TH17-Differenzierung sind IL-6, IL-23, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Die komplexen Regulationsmechanismen führen zu einer limitierten Immunantwort, chronischer Inflammation, Angiogenese und Tumorproliferation (Abb. Zamarron et Chen 2011).

### 1.2.2 Tumor und Inflammation

Die Tumorentwicklung von der Entstehung, über die Progression bis hin zu Metastasierung enthält immer eine inflammatorische Komponente. Beim Ovarialkarzinom ist der konkomitierende Aszites ein Ausdruck der Inflammation. Genau wie beim Immunsystem koexistieren stets pro- und antitumorigene Entzündungsmechanismen, die bei progredienten Tumoren zu protumorigenen Effekten verschoben sind (Bui et Schreiber 2007). Inflammation verursacht Zellschaden, oxidativen Stress und eine erhöhte Freisetzung von Zytokinen und Prostaglandinen (Ness et Cottreau 1999). Das begünstigt während der Tumorentstehung Mutationen, genomische Instabilität und epigenetische Modifikationen (Hussain et al. 2003). Im Zuge einer Entzündung werden Reparaturmechanismen aktiviert und Zytokine gebildet, die eine Proliferation der malignen Zellen fördern (Langowski et al. 2006). Auch eine durch Entzündung begünstigte Metastasierung wird vermutet (Grivennikov et al. 2010).

Chronische Entzündungen durch bakterielle oder virale Infektionen erhöhen das Risiko für Karzinome (de Martel et Franceschi 2009) ebenso wie für Autoimmunerkrankungen (Waldner et Neurath 2009).

Akute Entzündungen, wie sie im Rahmen der Chemotherapie auftreten, können allerdings die Immunantwort verstärken (Zitvogel et al. 2008). Davon differenziert werden muss die tumorassoziierte Inflammation. Da es bei Karzinomen nur selten zu einer natürlichen Regression kommt, wird davon ausgegangen, dass durch Immunoediting Tumorzellen die Immunantwort und Inflammation konstant modulieren (Smyth et al. 2006). Dabei werden die komplexen Mechanismen gestört, die zwischen der angeborenen Immunantwort aus Monozyten bzw. Makrophagen und der adaptiven Immunantwort aus den verschiedenen T- und B-Zellen bestehen. Die Ausprägung pro- und antitumorigener Komponenten bestimmt die Tumorentwicklung.

Der Aszites stellt ein geeignetes Tumormodell dar, da er Tumorzellen mit unterschiedlichen Resistenz- und Stammzeleigenschaften sowie Immunzellen des angeborenen Immunsystems (TAM) und adaptiven Immunsystems (Tregs, TH17-Zellen, CD4+ und CD8+ Effektor-T-Zellen) in ausreichender Menge enthält, sodass diese Zellen

## Einleitung

leicht isoliert werden können, um sie im Anschluss zu charakterisieren. Im Folgenden werden einzelne Immunzellsubsets, die im Rahmen dieser Arbeit im Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen untersucht wurden, näher beschrieben.

### 1.2.3 TH17-Zellen

T helper 17- bzw. TH17-Zellen sind ein Subset von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozythen, die das charakteristische Zytokin IL-17A (IL-17) produzieren. Die IL-17 Familie besteht aus den sechs Zytokinen IL-17A-F, von denen IL-17A das charakteristische ist. Darüber hinaus werden TH17-Zellen anhand des typischen Transkriptionsfaktors *retinoic acid receptor related orphan receptor* (ROR) $\gamma$ t identifiziert (Maniati et al. 2010). CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK-Zellen,  $\gamma\delta$ T-Zellen und andere Immunzellen können zwar ebenfalls geringe Mengen IL-17 produzieren (Aarvak et al. 1999), doch beim Ovarialkarzinom wurde das bisher nur für CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen (Kryczek et al. 2009a).

Es ist nicht klar, ob TH17-Zellen aus nativen Vorläuferzellen entstehen oder die gängigen Immunzellen lediglich IL-17-kompetent werden. TH17-Zellen haben eine hohe Plastizität und können sich unter Umwelteinflüssen dynamisch in andere T-Zell Subtypen umwandeln. Durch Sekretion von Zytokinen im Zuge der Immunantwort interagieren TH17-Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems. Während ihnen bei Infektionen eine protektive Rolle zugesprochen wird, wurde bei Autoimmunerkrankungen eine induzierende Wirkung durch dysregulierte TH17-Zellen beschrieben. Bei Tumorerkrankungen treten sowohl protumorigene als auch antitumorigene Effekte auf (Maniati et al. 2010).

Auch wenn die genauen Mechanismen der TH-17 abhängigen Immunantwort noch unklar sind, konnten bereits einige wichtige beteiligte Faktoren identifiziert werden. Schlüsselmoleküle bei der Differenzierung aus naiven T-Zellen sind IL-6, IL-21, IL-1 $\beta$ , Tumor-Nekrose-Faktort-alpha (TNF $\alpha$ ) und *transforming-growth-factor* (TGF)- $\beta$ . Neben ROR $\gamma$ t regulieren noch weitere Transkriptionsafktoren die TH-17 Entwicklung, unter anderem *nuclear-factor* (NF)-kappaB, *signal transducers and activators of transcription* (STAT)3 und *hypoxia-inducible-factor* (HIF)1 $\alpha$  (Hemdan et al. 2012). Die Erkenntnisse aus Experimenten bei anderen Tumorentitäten lassen sich allerdings nur eingeschränkt auf das Ovarialkarzinom übertragen und sind zum Teil kontrovers.

## Einleitung

Allgemein treten beim Ovarialkarzinom vermehrt TH17-Zellen im Tumormilieu gegenüber dem peripheren Blut auf (Kryczek et al. 2009).

Als besonderer Subtyp existieren IFN $\gamma$ +IL-17+ Zellen, die auch im Tumormilieu des Ovarialkarzinoms vorkommen und eine intermediäre Population zwischen TH17- und Effektor-T-Zellen sein könnten. Vor allem antitumorigene Funktionen der TH17-Zellen sind von der Fähigkeit zur IFN $\gamma$  Produktion abhängig (Muranski et al. 2008).

Die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Zytokinen macht es allgemein schwierig, die IL-17 abhängigen Effekte eindeutig kausal zuzuordnen, zumal noch viele andere Moleküle in die Regulationsprozesse eingreifen. Durch die Fähigkeit anderer Immunzellen zur IL-17-Bildung wird die Identifikation eindeutiger Ursache-Wirkungs-Beziehungen zusätzlich erschwert.

### 1.2.4 Protumorigene Funktionen von TH17-Zellen

Die Ergebnisse verschiedener Studien weisen protumorigene Funktionen von TH17-Zellen nach: Sowohl Tumorzellen als auch TH17-Zellen produzieren das Gewebshormon Prostaglandin-E2 (PG-E2), durch welches andere proinflammatorische Mediatoren supprimiert werden. In Folge führt dies zu einer Suppression von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) und natürlichen Killerzellen. Die sekundäre Immunantwort durch TH2-, TH17-Zellen und Tregs wird (u.a. durch Autostimulation) verstärkt, eine primäre Immunantwort gegen den Tumor bleibt aus (Hot et al. 2012).

Für das kolorektale Karzinom wurde eine negative Korrelation zwischen TH17-Zellen und der Expression von p53 in Tumorzellen beschrieben. p53 ist ein tumorsuppressor-Protein und wird als Prognosemarker verwendet. Demzufolge hatten in der Studie von Radosavljevic *et al.* (2010) Patientinnen mit hohem IL-17 Spiegel eine schlechte Prognose. Beim *Non-Small-Cell-Lung-Cancer* (NSCLC) und dem Magenkarzinom war darüber hinaus eine schlechte Prognose mit einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors STAT3 durch TH17-Zellen assoziiert (vgl.: Chen et al. 2010; Kim DY et al. 2009).

## Einleitung

TH17-Zellen werden durch Chemokine wie CCL5 und CCL2 ins Tumormilieu rekrutiert und in diesem proinflammatorischen Milieu können sie sich differenzieren und expandieren (Su et al. 2010). Für das HCC wurde eine ähnliche Wirkung von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-23 auf TH17-Zellen beschrieben. Diese Interleukine werden von TAMs gebildet. Wurde die Inflammation in vivo inhibiert, so reduzierten sich TH17-Zellzahl und Tumorgröße (Kuang et al. 2010a). Ein weiteres Interleukin im Tumormilieu ist IL-27, das wahrscheinlich von CTLs gebildet wird. IL-27 wirkt antiinflammatorisch und inhibiert TH17-Zellen.

TH17-Zellen selber produzierten beim HCC IFN $\gamma$ , IL-2, IL-22 (s.o.) und TNF $\alpha$ . Über diese Moleküle wird die Bildung von GranzymB und Perforin durch Effektorzellen inhibiert, sodass Tumorzellen schlechter lysiert werden können (Kuang et al. 2010 B).

Weitere protumorigene Funktionen erfüllen *homing* Moleküle wie CCR6 und CD161, die von TH17-Zellen, Tregs und DCs exprimiert werden. Beim NSCLC waren sie mit der Tumorprogression assoziiert und könnten eventuell als Prognosemarker dienen oder sogar Ziele einer Therapie sein.

Die Wirkung von TH17-Zellen auf die Angiogenese des Tumors ist ambivalent. In der Genese des Kolonkarzinoms bei Mäusen hatte IL-17F eine protektive Wirkung, wahrscheinlich über eine Angiogenese-Inhibition (Tong et al. 2012). Bei rheumatoider Arthritis hingegen wurde die Angiogenese von TH17-Zellen über CXC-Chemokine intensiviert (Pickens et al. 2010).

### 1.2.5 Antitumorigene Funktionen von TH17-Zellen

TH17-Zellen modulieren die Immunantwort und haben so indirekte antitumorigene Funktionen: Sie aktivieren CTLs und induzieren die MHC-I und –II Bildung, interagieren mit TH1-Zellen, bilden IFN $\gamma$  und supprimieren Tregs, denen protumorigene Funktionen zugeschrieben werden.

Ein zentrales Molekül der Interaktion zwischen TH17-Zellen und Tregs ist TGF- $\beta$ . Dieses Zytokin hat protumorigene Funktionen: Zum Beispiel inhibiert es die Antigen-Präsentation durch DCs (Novitsky et al. 2012). Bei hohen Konzentrationen TGF- $\beta$  können TH17-kompetent gewordene Tregs wieder in den nativen Typ

## Einleitung

zurückkonvertieren (Hemdan et al. 2012; Hemdan et al. 2010). IL-17 scheint also ein Gegenspieler von TGF- $\beta$  zu sein.

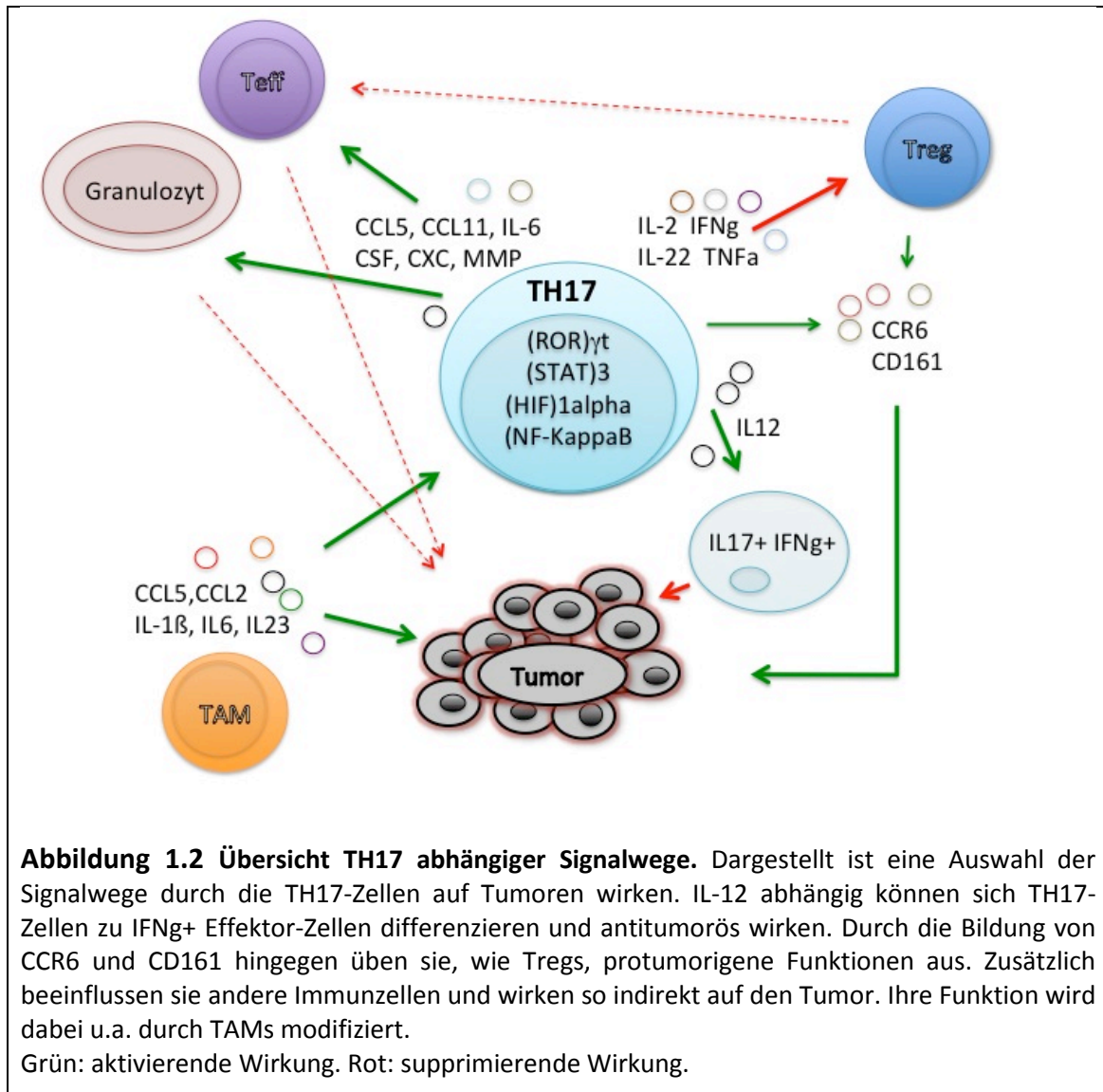
Beim Pankreas-Karzinom konnten Yamamoto et al. (2009) über eine Treg-Depletion und hohe Level von TH1- und TH17-Zellen die Anti-Tumor-Immunität. Allerdings bestand neben der oben beschriebenen STAT3 assoziierten schlechteren Prognose auch eine schlechtere Prognose bei erhöhter TH17-Antwort in Folge von vermindertem TGF- $\beta$  (Novitsky et al. 2011). TH17-Zellen schützen also nicht per se vor Tumoren.

Ein weiterer Zwischenspieler der Immunantwort ist IL-2. IL-2 inhibiert die TH17 Produktion und Differenzierung, aktiviert aber Tregs, denen eher protumorigene Eigenschaften zugeschrieben werden (Kryczek et al. 2007a). Auch eine IL-10 Verminderung zusammen mit einer TH17-Zell Erhöhung bei Mäusen führte zu einer geringeren inhibitorischen Treg-Funktion und einer verstärkten TH1 vermittelten antitumor-Antwort (Ma et al. 2011).

Bei der Autoimmun-Enzephalomyelitis wurde experimentell nachgewiesen, dass der IFN $\gamma$ +IL-17+ Subtyp zytotoxisches Potential besitzt, was für T-Helfer Zellen untypisch ist (Domingues et al. 2010). Tajima et al. (2011) konnten nachweisen, dass TH17-Zellen durch IL-12 zu IL-17/IFN $\gamma$  zu doppelt positiven Zellen werden können, die sogar zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen aufweisen.

Die Immunantwort wird direkt durch die Sekretion von verschiedenen Molekülen moduliert. Neben IL-17 und IFN $\gamma$  bilden TH17-Zellen *colony-stimulating factors* (z.B. GM-CSF), CXC Chemokine, Metallproteinasen (MMP6) und IL-6. Dadurch werden neutrophile Granulozyten mobilisiert und aktiviert. Über IL-25 werden darüber hinaus CC-Zytokine (CCL5, CCL11) induziert, durch die eosinophile Granulozyten aktiviert werden und die Expression von TH2 Molekülen verstärkt wird.

Die Induktion von CTLs durch TH17-Zellen konnte in vitro von Munegowda *et al.* (2011) als MHC-I und IL-2 vermittelt nachgewiesen werden. Für das Ovarialkarzinom vermittelte IL-2 allerdings ex vivo eine Treg Konvertierung in TH17-Zellen. Die genaue Funktion von IL-2 in vivo ist also noch unklar.



### 1.2.6 regulatorische T-Zellen (Tregs)

In Interaktion mit den bisher genannten Lymphozyten stehen Tregs, die über die Expression der Moleküle CD4, CD25 und den *forkhead box P3 transcription factor* (FoxP3) definiert werden. CD 25 bildet die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors. IL-2 ist essentiell für das Überleben von Tregs. In dieser Arbeit wird zusätzlich FoxP3 identifiziert. CD4<sup>+</sup>-CD25<sup>+</sup>-FoxP3<sup>+</sup> Zellen gelten als relevantester Treg-Typ und machen 10% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus. Allgemein können alle drei Moleküle auch von anderen T-Zellen exprimiert werden, sodass eine Differenzierung auf Grund einer hohen Plastizität der Tregs nicht exakt möglich ist. Die Typisierung schließt verschiedene funktionelle Tregs ein,

## Einleitung

darunter *resting*, *activated* und *cytokin-producing* Tregs, die nach der Expression von CD45RA noch näher differenziert werden können (Miyara et al. 2009).

Als fakultativer *Counterpart* zu den inflammatorischen TH1 Zellen supprimieren Tregs andere Immunzellen (CTLs, natürliche Killerzellen u.a.) durch die Zytokine IL-10, IL-6 und TGF- $\beta$ . Somit wirken sie überschießenden Autoimmunreaktionen entgegen und spielen mit ihrem suppressiven Potential bei der Immunhomöostase eine essentielle Rolle.

Man geht davon aus, dass es zwei Entwicklungswege für Tregs gibt: natural-Tregs (nTreg) entstehen im Thymus durch das Erkennen von Autoantigenen und sorgen für eine Immuntoleranz gegen körpereigene Zellen (Hsieh et al. 2004). Inducible-Tregs (iTreg) entwickeln sich hingegen aus konventionellen T-Zellen im peripheren Gewebe wie Schleimhäuten, wo sie Fremdanigene erkennen und so zum Beispiel eine Immuntoleranz im Darm gegen die Normalflora regulieren. Im Tumor steigert TGF- $\beta$  zusammen mit Retinolsäure die Expression von FoxP3 in nativen T-Zellen, die so zu iTregs konvertieren (Bilate et al. 2012). iTregs könnten auch durch Tumor-Antigene induziert werden und konsekutiv zu Immunsuppression führen. Es wurden allerdings noch keine Antigene identifiziert, die diese Hypothese unterstützen. Weiter ungeklärt ist auch, wie Tregs ins Tumormilieu rekrutiert werden. Beim Ovarialkarzinom ist bewiesen, dass hohe Konzentrationen von CCL22 die Treg Migration über den CCR4-Rezeptor induzieren (Curiel et al. 2004). Das spricht dafür, dass die Migration von Tregs über eine Chemokin-Rezeptor-Achse funktioniert.

Verschiedene Studien legen nahe, dass Tregs abhängig von Inflammation und Milieu kontextabhängige Transkriptionsprogramme adaptieren, durch welche sie auf prädominante Zielzellen wirken (Koch et al. 2009; Zheng et al. 2009; Chaudhry et al. 2009). Tregs üben, wie TH17-Zellen, sowohl pro- als auch antitumorigene Funktionen aus. Während beim HCC eine hohe Treg-Dichte mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, korreliert beim kolorektalem Karzinom (CRC) die Treg-Dichte mit einem verbessertem Outcome (Savage et al. 2013). Interessant ist beim CRC, dass ein hohes Vorkommen von IL-17 die Prognose verschlechtert (Tosolini et al. 2011), aber gleichzeitig IL-17 produzierende Tregs nachgewiesen werden können (Yang et al. 2010). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass TH17-Zellen durch Tregs gehemmt



## Einleitung

werden, indem diese einen TH17 Phänotyp adaptieren und das inflammatorische Tumormilieu supprimieren.

Eine protumorigene Wirkung von Tregs, speziell beim Ovarialkarzinom, ist die Angiogenese-Induktion unter hypoxischen Konditionen. Facciabene et al. (2011) konnten nachweisen, dass durch eine Überexpression von CCL28 auf Tregs die Angiogenese und die Produktion von VEGF gesteigert ist. Dieser Effekt lässt sich durch Treg-Depletion deutlich reduzieren.

So wie HCC Patienten haben auch Ovarialkarzinom-Patientinnen mit einem hohen Treg-Anteil im Tumormilieu eine schlechte Prognose, vor allem bei gleichzeitig geringer Rate von CD8+ Zellen (Curiel et al. 2004; Sato et al. 2005). Diese Beobachtungen legen eine Suppression der direkten antitumorigenen Immunantwort im Tumormilieu durch Tregs nahe.

Aktuelle Studien untersuchen, ob bestimmte *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) Gene beeinflussen, die in die Regulation von Treg-Funktionen involviert sind. Erste Ergebnisse konnten eine Auswirkung auf das Outcome beim Ovarialkarzinom durch SNPs in einzelnen Genen nachweisen. Meist beschränken sich die Korrelationen jedoch auf einen bestimmten histologischen Subtyp des Ovarialkarzinom (DeRycke et al. 2013). Die Aufklärung von spezifischen Transkriptionsprogrammen tumorinfiltrierender Tregs im Vergleich zu denen von Tregs im peripheren Blut hat zu einem besseren Verständnis der Mechanismen von Immuntoleranz und Tumorentwicklung geführt.

### **1.2.7 myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)**

Myeloid-derived cells (MDCs) sind eine heterogene Population myeloider Zellen, die unreife Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen umfasst und anhand der Rezeptoren CD11b und Gr-1 identifiziert werden. Unter dem Einfluss von Zytokinen (IL-6, IL-10, CSF-1, VEGF u.a.) können MDCs im Tumormilieu zu einem suppressiven Phänotyp (MDSCs) reifen (Serrafini et al 2006). Sie reagieren plastisch auf die Einflussfaktoren im Tumormilieu und üben sowohl pro- als auch antitumorigene Funktionen aus, wobei die protumorigene Wirkung durch eine Suppression v.a. der T-

## Einleitung

Zell Antwort überwiegt (He et al. 2010). Es ist davon auszugehen, dass sich die MDSC-Population aus mehreren Subpopulationen konstituiert. Unterschieden werden können mononuclear cells (MO-MDSCs), die inflammatorischen Monozyten ähneln, von low-density polymorphonuclear cells (PMN-MDSCs), die mit unreifen Neutrophilen vergleichbar sind (Movahedi et al. 2008). Beim Ovarialkarzinom gibt es Hinweise darauf, dass eine IL-17 abhängige TNF- $\alpha$  Produktion zur vermehrten Rekrutierung von MDSCs führt und das Tumorstadium gefördert wird (Charles et al 2009). Die genauen Funktionen und Einflussfaktoren von MDSCs in der Tumorentwicklung sind bislang aber noch weitestgehend unerforscht.

### 1.2.8 Tumor assoziierte Makrophagen

Monozyten sind die Vorläuferzellen der Makrophagen. Beide reagieren als Antwort auf Umwelteinflüsse durch Modifikation ihrer funktionellen Eigenschaften, können ihre Funktion und ihren Phänotyp also verändern und sind somit heterogen. Polariserte Makrophagen unterscheiden sich vor allem in der Expression von Rezeptoren und in der Produktion von Zyto- und Chemokinen. Im Tumormilieu wirken Zytokine von Tumor- und T-Zellen auf sie ein. TAMs bilden einen Großteil der den Tumor infiltrierenden Leukozyten und weisen einen aberranten Differenzierungs- und Polarisierungszustand auf, der dynamisch auf Signale im Tumormilieu reagiert, sodass sie die Tumorentwicklung und Ausbreitung verhindern, aber auch die Progression von Tumoren unterstützen können. Generell werden sie anhand der Oberflächenmarker CD11b, CD14, MHCII/HLA-DR und CD45 identifiziert. In Anlehnung an die Klassifikation von T-Zellen in TH1 und TH2 wurde versucht, die TAMs in M1 (klassisch aktiviert) und M2 (alternativ aktiviert) einzuteilen. Bei der Einteilung nach dem Polarisierungszustand handelt es sich um ein basales Grundkonzept, das ein Kontinuum verschiedener funktionaler Stufen beschreibt.

M1-Zellen gelten grundsätzlich als proinflammatorisch und potente Tumorsuppressoren. Sie werden durch Zytokine, wie IFN $\gamma$ , und bakterielle Bestandteile (Lipopolysaccharide) aktiviert, präsentieren ausgeprägt Antigene und bilden vor allem IL-12 und IL-23, durch welche die Chemokine CCR7 und FC $\gamma$ Rs induziert und die Typ-I T-Zell Antwort aktiviert werden (Cassetta et al. 2011). Darüber hinaus sind sie potente

## Einleitung

Effektor-Zellen, die Tumorzellen und Mikroorganismen abtöten. Über inflammatorische Zytokine rufen sie die adaptive Immunantwort hervor.

Der M2-Typ zeichnet sich durch einen IL-12<sup>low</sup>, IL-10<sup>high</sup>, CD163<sup>high</sup> und CD206<sup>high</sup> Phänotyp aus (Djemadji-Oudjil et al. 1996). Durch IL-4, IL-13, IL-10 oder Glucocortikoide wird eine alternative Aktivierung induziert und u.a. vermehrt CD14 exprimiert. Ihre Kapazität zur Antigenpräsentation ist gering. Die T-Lymphozyten Proliferation wird durch IL-10 gehemmt und M2-Zellen modulieren so die Immunantwort (Akila P. et al. 2012). Neben der Suppression der adaptiven Immunantwort steigern sie Angiogenese, Gewebeumbau- und Reparaturmechanismen (Mantovani et al. 2002). TAMs differenzieren sich eher in M2 und ihre Cytotoxizität gegenüber Tumorzellen ist gering auf Grund einer verminderten Produktion an Stickstoffmonoxid (NO) und proinflammatorischen Zytokinen (Mills et al. 2000).

TAMs in Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen weisen einen gemischten M1/M2 Phänotyp auf. Während einzelne M2 Marker wie z.B. CD163 erhöht sind und mit einer schlechten Prognose korrelieren (Reinartz et al. 2014), sind andere M2 Marker downreguliert (Torroella-Kouri et al. 2009).

Abgesehen vom NSCLC (Kim DW et al. 2008) korreliert die Konzentration von TAMs negativ mit der Prognose von Tumorerkrankungen wie dem Ovarialkarzinom. TAMs induzieren über die Expression von VEGF und Thrombospondin-1 die Angiogenese (Salvesen et al. 1998). Eine erhöhte Expression von *colony-stimulating factor 1* durch insbesondere M2 TAMs fördert neben der Tumorprogression zusätzlich die Chemoresistenz (Kawamura et al. 2009). Vor allem bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen (Stadium III-IV) ist bei hohen M2 TAM Konzentrationen das Outcome verschlechtert (Lan et al. 2013). Eine hohe M1 (HLA-DR+)/M2 (CD163+) ratio im soliden Ovarialkarzinom ist mit verlängertem Überleben assoziiert (Zhang et al 2014). Unabhängig von der Prognose steigt generell die Rate an TAMs und tumorinfiltrierenden Tregs mit dem Stadium des Ovarialkarzinoms (Mhawech-Fauceglia 2013).

### 1.3 FRAGESTELLUNG

Die Entwicklung und Progression maligner Tumore wird maßgeblich durch Entzündungsprozesse im Tumormikromilieu beeinflusst. TAMs, die einen aberranten Differenzierungs- und Polarisierungszustand aufweisen, spielen dabei eine zentrale Rolle. Eine weitere wichtige inflammatorische Komponente im Tumormilieu sind TH17-Zellen, die sowohl anti-tumorigene als auch pro-tumorigene Funktionen ausüben können. Dabei ist die Funktion von inflammatorischen TH17-Zellen und ihr Zusammenspiel mit anderen Immunzellen, insbesondere mit TAMs, in der Tumorgenese des Ovarialkarzinoms noch weitestgehend unerforscht. Ovarialkarzinome sind häufig begleitet vom Auftreten eines malignen Aszites, der Cytokine (z.B. IL-6 und IL-10) und Immunzellen enthält, und somit ein geeignetes Modell darstellt, um inflammatorische Zellsubsets und deren Interaktionen im Tumormikromilieu zu charakterisieren. Ein genaueres Verständnis inflammatorischer Mechanismen könnte neue Therapieoptionen eröffnen, um die bislang schlechte Prognose des Ovarialkarzinoms in Zukunft positiv zu beeinflussen.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern inflammatorische Immunzellen, wie TH17-Zellen und TAMs, die antitumorale Immunantwort im Tumormikromilieu des Ovarialkarzinoms beeinflussen. Dabei sollen Korrelationen und Zusammenhänge zwischen diesen inflammatorischen Zellsubsets untereinander sowie mit immunsuppressiven Zellsubsets (Treg, MDSC) und Effektor-T-Zellen im Aszites und peripherem Blut aufgezeigt werden.

Es wurden TAMs anhand mehrerer Oberflächenmoleküle identifiziert, um ihrem aberranten Differenzierungs- und Polarisierungszustand gerecht zu werden und sie dementsprechend einzuteilen. Daraufhin wurde untersucht, ob sich für einzelne TAM-Subtypen Korrelationen mit dem Vorkommen von TH17-Zellen signifikant nachweisen lassen und ob TH17-Zellen eine Wirkung auf immunsuppressive Immunzellen wie Tregs und MDSCs haben.

Dazu wurde zum einen die Frequenz von Tregs bzw. MDSC mit dem Vorkommen von TH17-Zellen korreliert. Zum anderen wurde die Assoziation zwischen TH17-Zellen und einer immunsuppressiven Treg-Funktionalität untersucht. Hierfür wurde ein Treg-

## Einleitung

Suppressionsassay durchgeführt, in dem die Hemmung der Proliferation von Effektor T-Zellen durch unterschiedlichen Treg Konzentrationen gemessen wurde. Die IFN $\gamma$ -Expression bzw. proliferative Aktivität von Effektor-T-Zellen wurde ebenfalls auf Korrelationen zu der Ausprägung von TH17-Zellen hin untersucht.

Unklar ist bisher auch, inwieweit sich die Anwesenheit von TH17-Zellen auf die Prognose auswirkt, weswegen die Krankengeschichte der Patientinnen nach der Probenentnahme weiterbeobachtet wurde, um retrospektiv Schlüsse auf die Prognose ziehen zu können. Interessant war dabei insbesondere die unterschiedliche Ausprägung von TH17-Zellen im peripheren Blut und dem Aszites, da es immer noch keinen verlässlichen Prognosemarker für das Ovarialkarzinom gibt und die Ergebnisse hierzu einen Beitrag leisten könnten.

## 2 MATERIAL

### 2.1 LABORGERÄTE

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
CO <sub>2</sub> -begaster Brutschrank	Heraeus Hera-cell 150	Thermo, USA
Fluorescence-activated cell sorter (FACS)	FACSCalibur, 2 Laser	BD, USA
Kühlschrank	Premium NoFrost, 4°C	Liebherr, Schweiz
Kühlschrank	Premium NoFrost, -20°C	Liebherr, Schweiz
Magnetischer Zellseparator	VarioMACS	Miltenyi, Deutschland
(Inverses) Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss, Deutschland
Pipetboy	pipetus	Hirschmann, Deutschland
Pipetten	Finnpipette (0,3-3µl, 3-30µl, 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Thermo, USA
Sterile Werkbank	Bio-II-A, class II cabinet	Telstar, Spanien
Stickstofftank	Apollo	Cryotherm, Deutschland
Tiefkühlschrank	Hera, freeze -85°C, Heraeus	Thermo, USA
Tischzentrifuge mit Kühlung	Biofuge fresco, Heraeus	Thermo, USA
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA Works, USA
Zählkammer	Neubauer improved 0,0025mm <sup>2</sup>	La fontaine, Deutschland
Zellzentrifuge	Multifuge 3 S-R, Heraeus	Thermo, USA

## Material

### 2.2 SOFTWARE

FACS Software	CellQuest Pro Software	BD, USA
Statistik Software	Excel Prism	Microsoft, USA GraphPad, USA

### 2.3 KITS

<b>Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit (with Golgi Plug)</b>  - Fixation/Permeabilization solution (125 ml) - Perm/Wash buffer, 10x Konzentrat mit Fetal Bovine Serum (FBS) und Saponin (1:10 in AquaDest gelöst) (100 ml) - BD GolgiPlug protein transport inhibitor mit brefeldin A (1 ml)	BD, USA
<b>Human Regulatory T cell Staining Kit</b>  FITC anti-human CD4 (RPA-T4) und APC anti-human CD25 (BC96) PE anti-human Foxp3 (PCH101) PE Rat IgG2a isotype control Normal Rat Serum Flow Cytometry Staining Buffer Fixation/Permeabilization Concentrate Fixation/Permeabilization Diluent Permeabilization Buffer (10X)	eBioscience, USA
<b>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>dim/-</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit II</b>  - CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>dim/-</sup> T-Zell Biotin Antikörper Cocktail II, human - Anti-Biotin MicorBeads - CD25 MicroBeads II, human	Miltenyi, Deutschland
<b>CFSE Cell Proliferation Kit</b>  - CellTrace CFSE (mit lyophilized powder) - DMSO	Life Technologies, USA

## Material

### 2.4 VERBRAUCHSMATERIAL

FACS-Röhrchen	Flow Cytometry Tubes (5ml)	Sarstedt, Deutschland
MACS Separationssäulen	MACS LD- und MS-Säulen	Miltenyi, Deutschland
Kryoröhrchen	Cryo Tube <sup>TM</sup> Vials (1,8ml)	Nunc, Dänemark
Monovetten	Li-Hep-Gel	Sarstedt, Deutschland
Multi-Well Zellkulturplatten	Cellstar (96er, 24er, 12er, 6er)	Greiner bio-one, Deutschland
Pipettenspitzen	Finntip (10 µl; 0,5-200µl; 30-300µl; 100-1000µl)	Thermo, USA
sterile serologische Pipetten mit Spitze	Cellstar (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Greiner bio-one, Deutschland
Verschlussfolie	Parafilm	Pechiney, USA
Zentrifugenröhre	Röhre (15ml, 50ml)	Sarstedt, Deutschland

### 2.5 ANTIKÖRPER UND MICROBEADS

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Hersteller
Anti-human CCR7	3D12	PE	BD Pharmingen, USA
Anti-human CD4	RFT-4g	PeCy7	Southern Biotech, USA
Anti-human CD4	VIT4	FITC	Miltenyi, Deutschland
Anti-human CD8	BW135/80	APC	Miltenyi, Deutschland
Anti-human CD11b	ICRF44	PE	eBioscience, USA
Anti-human CD14	TÜK4	FITC	Miltenyi, Deutschland
Anti-human CD25	4E3	APC	Miltenyi, Deutschland
Anti-human CD16	CB16	PE-Cy7	eBioscience, USA
Anti-human CD32	6C4	APC	eBioscience, USA
Anti-human CD33	WM-53	PE-Cy7	eBioscience, USA



## Material

Anti-human CD64	10.1	PE	eBioscience, USA
Anti-human CD68	Y1/82A	FITC	eBioscience, USA
Anti-human CD163	GHI/61	PE	eBioscience, USA
Anti-human CD206	15-2	APC	Biozol, Deutschland
Anti-human FoxP3	3G3	PE	Miltenyi, Deutschland
Anti-human HLA-DR	LN3	APC	eBioscience, USA

Mouse IgG	polyclonal		Dianova, Deutschland
Anti-human IFN $\gamma$	4S.B3	FITC	eBioscience, USA
Anti-human IL-10	JES3-19F1	PE	BD Pharmingen, USA
Anti-human IL-12	C11.5	FITC	BD Pharmingen, USA
Anti-human IL-17A	64CAP17	PE	eBioscience, USA

### Isotypenkontrolle:

Mouse IgG1	P3.6.2.8.1	APC	eBioscience, USA
Mouse IgG1	A85-1	FITC	BD Pharmingen, USA
Mouse IgG1	MOPC-21	PE-Cy7	BD Pharmingen, USA
Mouse IgG1	M1-14D12	PE	eBioscience, USA
Mouse IgG1	P3.6.2.8.1	PE-Cy7	eBioscience, USA
mouse IgG2a	X-57	FITC	Miltenyi, Deutschland
Mouse IgG2a	X-39	PE	BD Pharmingen, USA
Mouse IgG2b	eBMG2b/IS6-11E5.11	APC	eBioscience, USA/ Miltenyi, Deutschland
Mouse IgG2b	eBMG2b/IS6-11E5.11	FITC	eBioscience, USA/ Miltenyi, Deutschland
Rat IgG2a	R35-95	PE	BD Pharmingen, USA

### Microbeads

CD14-Microbeads			Miltenyi, Deutschland
-----------------	--	--	-----------------------

## 2.6 PUFFER, LÖSUNGEN UND SONSTIGE CHEMIKALIEN

Reagenz	Zusammensetzung /Lagerung	Hersteller
Aqua dest., Wasser für Injektionszwecke		Serumwerk, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin, Cohn Modified)		Biomedicals,USA
Natriumacid		Sigma, USA
PBS Dulbeccos's without Ca & Mg (1x)		PAA, Österreich
Cellwash	PBS + 0,01% Natriumazid	PAA, Österreich
CFSE (C <sub>29</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>11</sub> ) CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit - For Flow Cytometry	Stocklösung (CFSE): Lyophilisation in 18µl DMSO (Konzentration: 5 mM CFSE)	Life Technologies, USA
CFSE-Labeling Buffer	PBS / 0,1%BSA	Life Technologies, USA
DMSO Hybri-Max (Dimethyl Sulphoxide)		Sigma, USA
Deoxyribonuclease I (DNase I)		Sigma, USA
FCS (fetales Kälberserum)		PAA, Österreich
Einfriermedium	FCS + 10% DMSO	
EDTA (Ethylendiamine-tetraaceticacid)	2Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	Carl Roth, Deutschland
FACS Clean, FACS Rinse, FACS Flow		BD Pharmingen, USA
FACS Waschpuffer	Cellwash+2% FCS	
Ficollgradient	Lymphozyten-Separationsmedium	PAA, Österreich
Ionomycin	Stock in DMSO 1mg/ml	eBioscience, USA
RPMI 1640 mit stabilem L-Glutamine		PAA, Österreich
Kulturmedium	RPMI (2g/l NaHCO <sub>3</sub> , 0,532g/l stabieles L-Glutamin) /10% FCS,	PAA, Österreich

## Material

	100mM Sodium Pyruvat, 10mg/ml Penicillin/Streptomycin	
MACS-Puffer	2mM EDTA, 0,5% BSA in PBS pH 7.2 (steril filtriert)	Miltenyi, Deutschland
PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)	Stock in DMSO 1mg/ml	eBioscience, USA
KHCO <sub>3</sub> (Kaliumhydrogencarbonat)		Merck, Deutschland
NH <sub>4</sub> Cl (Amoniumchlorid)		Sigma, USA
RBC-Lysispuffer	155mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0,1mM EDTA, pH 7,2-7,4	
FACS-Staining Solution	steriles PBS + 1% FCS	PAA, Österreich

## 2.7 PATIENTENKOLLEKTIV

Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren venösen Blut (2x8ml heparinisiertes Vollblut) und intraoperativen Aszites-Punktat von Ovarialkarzinom-Patientinnen gewonnen, die an der Studie „Rolle von Peroxisome-Proliferator-activated Receptors  $\beta/\delta$  (PARP $\beta/\delta$ ) in der Aktivierung tumor-assoziiierter Makrophagen (TAM) von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom“ (Positives Ethikvotum vom 21-12-2010; Az: 205/10 liegt vor) teilnehmen. Die Proben stammen ausschließlich von Patientinnen, bei denen eine primäre Operation erfolgte. Operationen von Rezidiven wurden nicht in die Studie mit einbezogen. Die Patientinnen wurden bis zum 18.02.2013 nachbeobachtet. Die Zusammenfassung der klinischen Daten mit dem TAM-Phänotyp (CD163<sup>high/low</sup>) der 20 analysierten Patientinnen stellt Tabelle 2.1 dar. Mit Ausnahme von 3 Patientinnen konnte eine Assoziation zwischen klinischem Verlauf und dem Vorkommen einzelner Immunsubsets untersucht werden.

**Tabelle 2.1 Patientenkollektiv (n=20)**

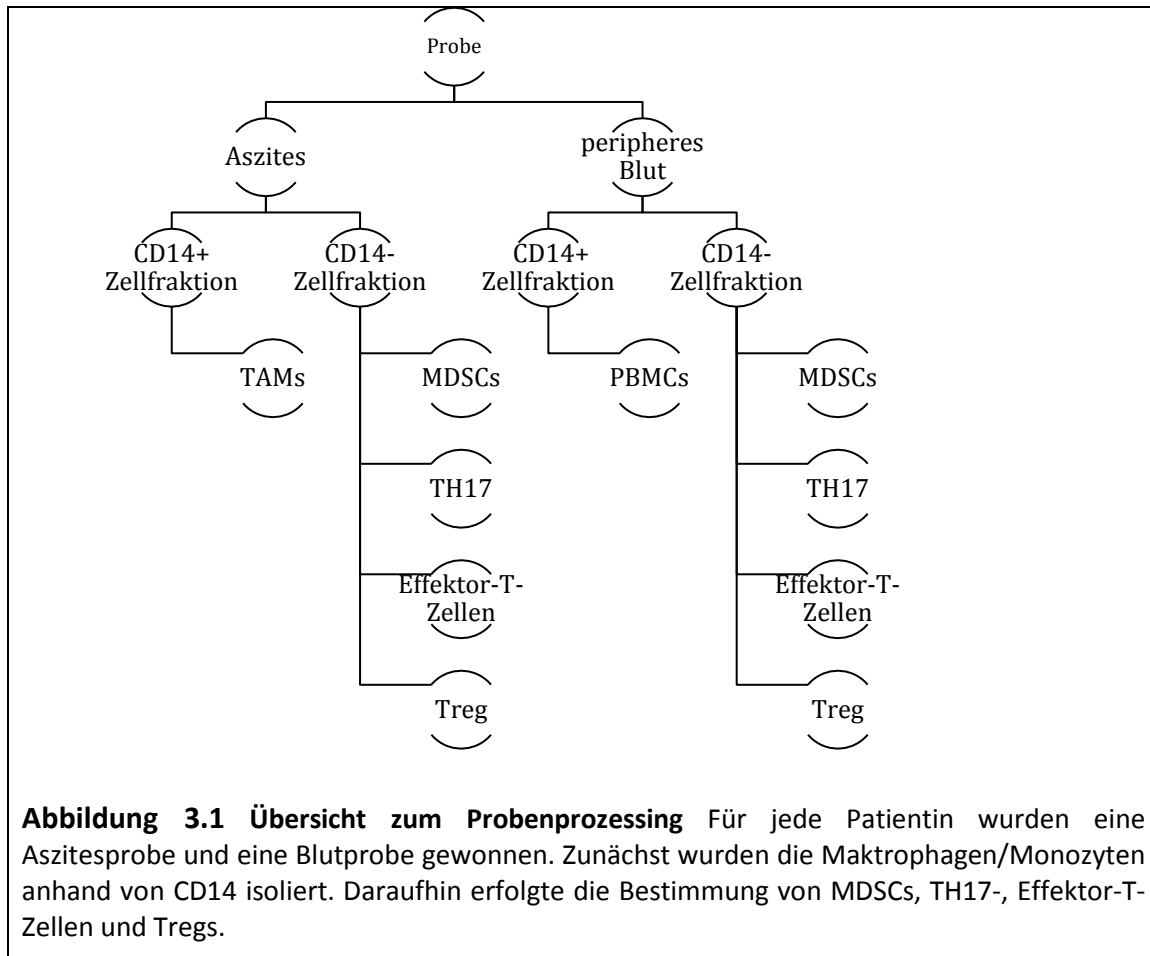
Patient (Nr.)	Alter	Stadium	Histologie	TAM Phänotyp	Rezidiv (Monate)	Rezidivfrei (Monate)	zensiert
TAM_11	72	G2	pT3c	CD163 <sup>low</sup>	14		nein
TAM_12	81	G2	Peritoneum	CD163 <sup>low</sup>			ja
TAM_13	57	G3	pT3c	CD163 <sup>high</sup>		29	ja
TAM_14	71	G2	pT3c	CD163 <sup>high</sup>			ja
TAM_15	69	G3	pT3c	CD163 <sup>high</sup>	13		nein
TAM_17	66	G2	pT3c	CD163 <sup>high</sup>	14		nein
TAM_18	65	G2	pT3c	CD163 <sup>low</sup>	16		nein
TAM_19	59	G2	pT3c	CD163 <sup>low</sup>	6		nein
TAM_20	74	G2-3	pT3c	CD163 <sup>high</sup>	8		nein
TAM_21	48	G2	pT3c	CD163 <sup>high</sup>	12		nein
TAM_22	71	G2	pT3c	CD163 <sup>high</sup>	10		nein
TAM_23	72	G2	pT3c	CD163 <sup>low</sup>		13	ja
TAM_24	35	G2	pT1c	CD163 <sup>low</sup>		13	ja
TAM_25	76	G2	pT3c	CD163 <sup>high</sup>	7		nein
TAM_26	74	G2	pT3b	CD163 <sup>low</sup>		12	ja
TAM_27	72	G3	pT3c	CD163 <sup>low</sup>		11	ja
TAM_28	71	G3	Peritoneum	CD163 <sup>low</sup>		11	ja
TAM_29	46	G3	pT3c	CD163 <sup>high</sup>		11	ja
TAM_30	54	G3	pT3c	CD163 <sup>high</sup>		10	ja
TAM_31	60	G3	pT3c	CD163 <sup>low</sup>		9	ja

Patienten, die nicht in Survivalanalysen mit einbezogen werden (n=6):  
 TAM\_12, 14 und 26: Ausschluss wegen Tumorunabhängigem Todesfall  
 TAM\_19: Ausschluss wegen neoadjuvanter Chemotherapie  
 TAM\_11 und 13: Ausschluss wegen extremer Varianzen im Vergleich zum Gesamtkollektiv  
 TAM\_16: komplett aus Daten entfernt, da Pancreas-CA statt Ovarial-CA

### 3 METHODEN

#### 3.1 ÜBERSICHT ÜBER DAS PROBENPROZESSING

Im Rahmen der Studie „Rolle von Peroxisome-Proliferator-activated Receptors  $\beta/\delta$  (PARP $\beta/\delta$ ) in der Aktivierung tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom“ (Positives Ethikvotum vom 21-12-2010; Az: 205/10 liegt vor, siehe Anlage) wurde Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (FIGO III/IV) Aszitesflüssigkeit intraoperativ entnommen. Peritoneale monozytäre Zellen (PC) wurden zunächst aus der Aszitesflüssigkeit über einen Ficollgradienten isoliert und anschließend mittels MACS in CD14<sup>+</sup> und CD14<sup>-</sup> Zellfraktionen separiert. Die CD14<sup>+</sup> Makrophagen wurden anhand unterschiedlicher Antikörperfunkombinationen durchflusszytometrisch phänotypisiert, um deren Polarisierungszustand (CD163<sup>low</sup> versus CD163<sup>high</sup> -Status) genauer zu beschreiben. Analog dazu erfolgten die Isolierung von peripheral-blood-mononuclear-cells (PBMCs) aus peripherem Blut sowie die Separation und Phänotypisierung von CD14<sup>+</sup> Monozyten. Für die weiteren Analysen wurden die CD14<sup>-</sup> Fraktion aus peripherem Blut und Aszites unmittelbar nach Isolierung cryokonserviert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aus dem peripheren bzw. peritonealen CD14<sup>-</sup> Zellpool die Frequenz der TH17-Zellen anhand der IL-17-Expression sowie der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen anhand der INF $\gamma$ -Expression und proliferativen Kapazität durch FACS-Analyse bestimmt. Desweiteren wurden innerhalb der CD14<sup>-</sup> Zellfraktion suppressive Zellpopulationen wie MDSCs und Tregs quantifiziert (Abb. 3.1).



### 3.2 ISOLIERUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN AUS ASZITES UND PERIPHEREM BLUT MITTELS

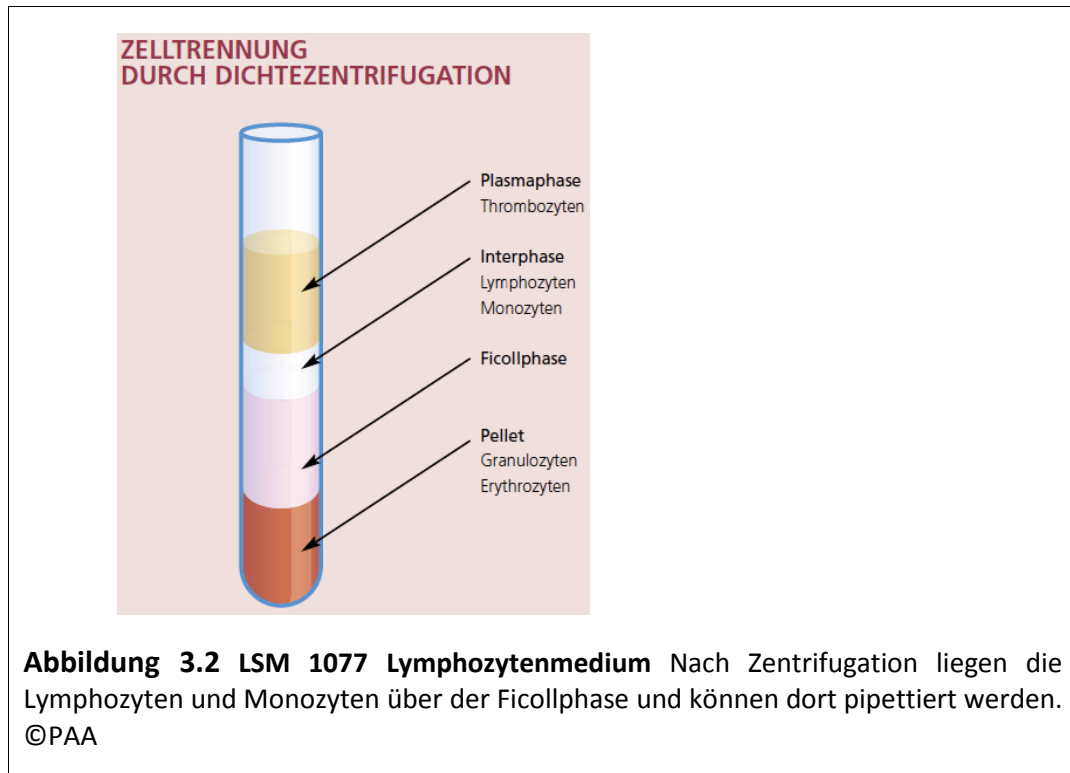
#### FICOLLGRADIENT

Die intraoperativ durch Aszitespunktion gewonnene Probe wurde direkt im Anschluss zunächst bei 300g und Raumtemperatur (RT) für 10 Min zentrifugiert. Der Überstand aus Aszitesflüssigkeit wurde abpipettiert und das Zellpellet aus peritonealen Zellen in 20ml *PBS* resuspendiert. Das heparinisierte Vollblut wurde zu gleichen Teilen in *PBS* verdünnt, was zu einer besseren Reinheit der PBMCs führte. Anschließend konnte die Aufreinigung peritonealer und peripherer mononukleärer Zellen über den Ficollgradienten erfolgen.

Bei diesem physikalischen Trennverfahren macht man sich die unterschiedliche Dichte einzelner Zelltypen zunutze und trennt Makrophagen, Monozyten und T-Zellen durch isopyknische Zentrifugation von Zelldetritus, Thrombo-, Granulo- und Erythrozyten. Zunächst wurden 15ml Ficolllösung lichtgeschützt auf RT erwärmt und dann in einem

## Methoden

50ml Falkonröhrchen mit der Asziteszellsuspension bzw. dem verdünnten Heparinblut vorsichtig überschichtet. Anschließend wurde die Probe für 20min bei 1200g ohne Bremse zentrifugiert. Die Trennlösung ist ein hydrophiles Polymer aus Saccharose und hat eine Dichte von 1,077g/ml. Die Ficollphase liegt zwischen der Interphase aus Mono- und Lymphozyten ( $\sim 1,07$ ) und dem Pellet aus Erythro- und Granulozyten ( $\sim 1,08$ ), welche die Ficollphase bei der Zentrifugation passieren (Abbildung 3.2).



Der Interphasering mit den mononukleären Zellen konnte mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und in ein steriles 50ml Röhrchen überführt werden. Die Probe wurde mit dem doppelten Volumen an *PBS* gewaschen und bei 300g 10 min RT zentrifugiert. Bei einer Erythrozytenkontamination im Pellet musste in einem Zwischenschritt das Pellet in 3ml *RBC Lysispuffer* resuspendiert, 5min bei RT inkubiert und anschließend mit 30ml *PBS* gewaschen werden (Zentrifugation s.o.). Danach konnten die PCs bzw. PBMCs mit 10ml sterilem *PBS* resuspendiert werden. Zur Eliminierung von Zellaggregaten, welche die nachfolgenden MACS-Separationen nachteilig beeinflussen könnten, wurden die PCs (PBMCs nur im Falle von sichtbaren Zellaggregaten) über ein 40µm Zellsieb filtriert. Der Durchfluss wurde abzentrifugiert (s.o.) und für die anschließende CD14-MACS-Selektion in MACS-Puffer resuspendiert.

## Methoden

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden bei 40facher Vergrößerung die Zellen in mindestens zwei großen Quadraten ausgezählt. Ein Quadrat steht für 1µl Zellsuspension, sodass nach folgender Formel die Anzahl an vitalen Zellen pro ml berechnet werden konnte:

$$\frac{\text{vitale Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000}{\text{Anzahl der Eckquadrate}}$$

**Abbildung 3.3 Formel zur Berechnung der Zellzahl**

Um die benötigte Zellkonzentration für die nachfolgende CD14-Zellseparation kalkulieren zu können, erfolgte zusätzlich eine kurze FACS-Kontrollfärbung mit anti-human CD14 FITC Antikörper. Dazu wurden  $5 \times 10^4$  Zellen in 100µl Cellwash mit 1µl anti-human CD14 FITC für 5min bei RT im Dunkeln inkubiert und ohne weiteres Waschen direkt im FACS gemessen (s. Kapitel Durchflußzytometrie).

Die Bestimmung von Th17-Zellen, Tregs und IFNγ-produzierenden Effektor-T-Zellen erfolgte mit mononukleären Zellen, die bei -196°C in flüssigem Stickstoff cryokonserviert wurden. Nach der oben beschriebenen Isolierung der Zellen wurden diese mit eiskaltem Einfriermedium langsam beschichtet, um eine Bildung von Eiskristallen und damit verbundener Schädigung der Zellen zu verhindern. Im Anschluss wurden die Zellen resuspendiert und auf 1ml Kryoröhrchen verteilt. Mit Hilfe einer Isopropanol enthaltenden Einfrierhilfe-Dose wurden die Röhrchen um 1°C/min auf -80°C abgekühlt und abschließend in einem Flüssigstickstoff-Tank gelagert.

Bei Bedarf wurde die jeweilige Probe dem Tank entnommen und zur Mykoplasmen-Dekontamination mit Methanol besprüht. Das Auftauen erfolgte schonend im 37°C warmen Wasserbad. Anschließend konnte die Zellsuspension in ein 50ml Falcon Tube überführt und langsam mit kaltem Kulturmedium überschichtet werden. Nach einer Zentrifugation (260g, RT, 10min) wurde das im Einfriermedium enthaltene DMSO abpipettiert und die Probe in frisches Kulturmedium resuspendiert. Je nach folgendem Versuch erfolgten eine weitere Aufreinigung (z.B. von Tregs), Stimulation oder Kultivierung.



### 3.3 MAGNETISCHE ZELLSEPARATION (MACS) CD14+ MONOZYTEN BZW. MAKROPHAGEN

Diese Methode der Zellsortierung funktioniert über das magnetische *labelling* von Zellen durch spezifische superparamagnetische Mikropartikel (s.g. MicroBeads). Die Zellsuspension enthält magnetische und nicht magnetische Zellen, die eine Trennsäule in einem Magnetfeld durchlaufen. Dabei bleiben die vorher markierten Zellen in der Säule arretiert, während der andere Teil die Säule durchläuft. Die gesuchte Zellpopulation kann danach außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden.

Die Zellen wurden einmalig in 5ml MP gewaschen (300g, 10min, 4-8°C) und in 80µl MP pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. Danach wurden 20µl CD14 MicroBeads hinzugefügt, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und bei 4°C für 15min inkubiert. Die Kapazität der Säulen liegt bei maximal  $1 \times 10^7$  gelabelte CD14+ Zellen (max.  $1 \times 10^8$  Gesamtzellzahl). Bei einer Konzentration von über  $10^7$  Zellen wurde das Volumen von MP und MicroBeads proportional erhöht. Nach einem weiteren Waschschrift in 2ml MP wurden die Zellen in 500µl MP resuspendiert und über die äquilibrierte MACS-Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend dreimal mit 500µl MP nachgewaschen und die CD14- Durchfluss- und Waschfraktion gepoolt. Anschließend wurde die Säule vom Magneten getrennt. Mit 1ml MP konnten die gelabelten CD14+ Zellen (Makrophagen bzw. Monozyten) eluiert werden. Die Zellzahl der CD14+ und CD14- Fraktionen wurden unter dem Mikroskop und die Reinheit der MACS über eine kurze FACS-Kontrollfärbung mit anti-human CD14 FITC Antikörper bestimmt (s.o.). Die Reinheit der CD14+ Makrophagen lag i.d.R. bei >90%, die der CD14+ Monozyten >95%.

Die CD14+ Fraktionen wurden unmittelbar nach Isolierung für die FACS-Phänotypsierung der peritonealen Makrophagen bzw. Makrophagen-Vorstufen im peripheren Blut verwendet (s. Kapitel 3.4). Die CD14- Zellfraktionen wurden z.T. frisch für die Phenotypisierung der MDSC (s. kapitel 3.5) verwendet, und die restlichen Zellen für die Analyse der Treg, TH17 und Effektor-T-Zellsubsets cryokonserviert.

### 3.4 PHENOTYPING TUMOR ASSOZIIERTER MAKROPHAGEN AUS ASZITES BZW. PERIPHERER MONOZYTEN

Die Daten zur Phenotypisierung tumor-assoziiierter Makrophagen bzw. peripherer Monozyten wurden im Rahmen der Studie „Rolle von Peroxisome-Proliferator-activated Receptors  $\beta/\delta$  (PARP $\beta/\delta$ ) in der Aktivierung tumor-assoziiierter Makrophagen (TAM) von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom“ (Positives Ethikvotum vom 21-12-2010; Az: 205/10 liegt vor) erhoben und standen für die Korrelationsanalysen zur Verfügung. Die durchflußzytometrische Phänotypisierung wurde wie folgt durchgeführt:

Für die Klassifikation der TAM / Monozyten wurden folgende Antikörperfunkombinationen eingesetzt.

- TAM/Monozyten Ansatz 1: Isotypenkontrolle A (mouse FITC/mouse PE/mouse PE-Cy7/mouse APC)
- TAM/Monozyten Ansatz 2: CD14 FITC / CD64 PE / CD16 PE-Cy7 / HLA-DR APC
- TAM Ansatz 3: Isotypenkontrolle B (mouse FITC intrazellulär/rat PE intrazellulär /mouse APC)
- TAM Ansatz 4: CD68 FITC intrazellulär/ CCR7 PE / CD32 APC
- TAM Ansatz 5: CD68 FITC intrazellulär/ CD163 PE /CD206 APC
- TAM Ansatz 6 IL-12 FITC intrazellulär/ IL-10 PE intrazellulär/ CD206 APC

Zunächst wurden die  $1 \times 10^5$  CD14+ Zellen auf 6 FACS-Röhrchen verteilt und mit 1ml *Staining Buffer* gewaschen (500g, 5min, RT). Anschließend erfolgte ein Blockierung der Fc-Rezeptoren auf Monozyten/Makrophagen mit 50µl mouse IgG (Stock 11,3 mg/ml 1:100 in Staining Buffer verdünnt) für 15min bei 4°C. In Ansatz 4 wurden nun 5µl des Antikörpers anti-CCR7-PE auf ca 100µl Zellsuspension hinzugegeben und für 30min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die weitere Oberflächenfärbung wie folgt:

- TAM Ansatz 1:  
1µl isotype-FITC mouse  
1µl isotype-PE mouse  
1µl isotype-PE-Cy7 mouse  
1µl isotype-APC mouse
- TAM Ansatz 2:  
1µl CD14 FITC  
1µl CD64 PE  
1µl CD16 PE-Cy-7  
1µl HLA-DR APC
- TAM Ansatz 3:  
1µl isotype-APC mouse
- TAM Ansatz 4:  
1µl CD32 APC

## Methoden

- TAM Ansatz 5: 1µl CD163 PE  
1µl CD206 APC
- TAM Ansatz 6: 1µl CD206 APC

Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 4°C wurde mit 1ml *Staining Buffer* gewaschen (s.o.). Die Ansätze 1 und 2 konnten bis zur Messung bei 4°C gelagert werden. Für die folgende intrazelluläre Färbung der Ansätze 3 – 6 wurde das BD Cytfix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit verwendet. Es erfolgte zunächst eine Permeabilisierung der Zellmembran, damit die Färbeantikörper für die intrazelluläre Anfärbung in die Zellen diffundieren konnten. Dazu wurden pro Ansatz 250µl *Fixation/Permeabilization (Fix/Perm) working Solution* verwendet und für 20 Min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde zweimalig mit je 1ml *Perm/Wash Solution* gewaschen, damit die entstandenen Poren in der Zellwand sich nicht wieder schließen. Für die intrazelluläre Färbung wurden folgende Antikörper zugegeben:

- TAM Ansatz 3: 1µl isotype-FITC mouse  
1µl rat PE intra
- TAM Ansatz 4: 2µl CD68 FITC
- TAM Ansatz 5: 2µl CD68 FITC
- TAM Ansatz 6: 0,5µl IL-12-FITC  
1µl IL-10-PE

Nach einer Inkubation von über 30 Min bei 4°C im Dunkeln und nach einmaligem Waschen mit 1ml *Perm/Wash Solution* sowie Resuspension in 250µl *Staining Buffer* konnte die Messung am FACS erfolgen.

### 3.5 QUANTIFIZIERUNG VON MDSCs IM ASZITES UND PERIPHEREM BLUT

Das Phänotyping der MDSC erfolgte parallel nach dem gleichen Prinzip, allerdings mit der CD14- Zellfraktion und anderen Oberflächenantikörpern. Es wurden ein Analyse-Tube und eine Isotypenkontrolle mit je  $1 \times 10^5$  Zellen verwendet. Nach dem oben beschriebenen Waschen und Fc-Block erfolgte die Oberflächenfärbung mit folgenden Antikörpern:

- MDSC Tube 1: 1µl isotype-FITC mouse  
1µl isotype-PE mouse  
1µl isotype-PE-Cy7 mouse
- MDSC Tube 2: 1µl CD14 FITC

## Methoden

1µl CD11b PE

1µl CD33 PE-Cy-7

Die Inkubation und das weitere Prozedere verliefen entsprechend dem TAM Phänotyping.

### 3.6 QUANTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON TREGS IM ASZITES UND PERIPHEREM BLUT

#### 3.6.1 Bestimmung CD4+CD25+FoxP3+ Tregs

Zum Nachweis von *Tregs* haben sich die Marker CD4, CD25 und FoxP3 etabliert. Für die Färbung wurden die cryokonservierten CD14- Fraktionen lymphozytärer Zellen aus Aszites und peripherem Blut aufgetaut (s. Kapitel 3.2.1).

$1 \times 10^5$  CD14- Zellen wurden zunächst mit 1ml PBS für 5min bei 500g und RT gewaschen, danach wurde die Oberflächenfärbung durchgeführt. Von dem monoklonalem Antikörper *CD4-FITC* wurden 2,5µl hinzugegeben und von dem monoklonalem Antikörper *CD25-APC* 2µl. Anschließend inkubierten die Zellen für 30min im Kühlschrank (KS) bei 4°C im Dunkeln. Durch einen weiteren Waschschrift wurden die Antikörper, die noch nicht gebunden hatten, nach o.g. Schema entfernt. Um den Transkriptionsfaktor FoxP3 nachzuweisen, musste die Zellwand zunächst permeabilisiert werden, damit die Färbeantikörper in die Zellen diffundieren konnten. Abweichend vom TAM Phänotyping wurde das Human Regulatory T cell Staining Kit (PE FoxP3 PCH101, FITC CD4, APC CD25, eBioscience) verwendet, da FoxP3 nicht wie die Zytokine im Zytosol vorkommt, sondern im Zellkern. Zunächst erfolgte eine Zugabe von 1ml *Fixation/Permeabilization (Fix/Perm) working Solution* und eine Inkubation über eine Stunde im KS. Die *Fix/Perm working solution* wurde in zwei Waschschriften wie oben entfernt. Statt *PBS* wurde dabei allerdings je 2ml *Permeabilization Buffer working Solution* verwendet, die dafür sorgte, dass sich die entstandenen Poren in der Zellwand nicht schließen konnten. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 10µl des monoklonalen Antikörpers *Anti-human FoxP3-PE* bzw. einer entsprechenden *Isotypkontrolle (10µl rat IgG PE)* für 30min im Dunkeln bei 4°C inkubiert.

## Methoden

Nach einem letzten Waschschrift mit 2ml *Permeabilization Buffer working Solution* konnte der Anteil an CD4+CD25+FoxP3+ Treg in der Probe durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

### 3.6.2 MACS Selektion CD4+CD25+CD127<sup>dim/-</sup> Tregs

Um Proliferationsunterschiede zwischen An- und Abwesenheit von Tregs festzustellen, mussten diese aus den zu untersuchenden Proben zunächst entfernt werden. Für die MACS-Selektion der CD4+CD25+CD127<sup>dim/-</sup> Tregs wurden die cryokonservierten CD14<sup>-</sup> Zellen aus Aszites bzw. peripherem Blut nach dem Auftauen (s.o.) zunächst in 1ml Kulturmedium (RPMI1640/10% FCS) mit 40µl DNase Stock für 30 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Der Stock enthielt 2500 U/ml, sodass die Endkonzentration von DNase in der Probe 100 U/ml betrug. DNase baut genomische DNA ab, die von absterbenden Zellen ins Medium abgegeben wird und zur Zellaggregation und damit zur erhöhten Viskosität der Probe führt und somit bei der nachfolgenden MACS-Separation z.B. die Säule verstopfen könnte. Die Selektion der Tregs erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die CD4<sup>+</sup> und CD127<sup>high</sup> Zellen indirekt mit Biotin konjugierten Antikörpern und Anit-Biotin MicroBeads gelabelt und über die erste MACS (LD) Säule positiv selektiert. Im zweiten Schritt wurden die zuvor negativ selektierten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>dim/-</sup> Tregs direkt mit CD25 MicroBeads gelabelt und von den übrigen CD4<sup>+</sup> Zellen durch positive Selektion über eine zweite MACS (MS) Säule getrennt.

Für die LD-Säule wurde die CD14<sup>-</sup> Zellfraktion (i.d.R. 10<sup>7</sup> Zellen) in 3 ml MP gewaschen, zentrifugiert (300g, 5min, 4°C), bevor der Überstand anschließend in 40µl MP resuspendiert wurde. Bei veränderten Zellzahlen wurden alle Volumina proportional angepasst. Danach wurde der Zellsuspension 10µl *Biotin-antibody-cocktail* zugegeben und die Probe für 10min im KS inkubiert, bevor anschließend noch einmal MP hinzugefügt (30µl) wurde und die Zellen mit 20µl *anti-biotin-microbeads* gelabelt wurden. Nach erneuter Inkubation im KS (15min) erfolgte ein Waschschrift (s.o.) mit 2ml MP und einer Resuspension in 500µl MP. Die Probe konnte nun auf die im Vorfeld mit 2ml MP äquibrierte MACS-LD-Säule gegeben werden. Nach zweimaligem Waschen mit je 2ml MP konnten die gebundenen Zellen mit weiteren 2ml MP abgelöst

## Methoden

werden. Im Durchfluss befanden sich die CD4<sup>+</sup>, CD127<sup>dim</sup><sup>-</sup> und im Eluat die CD4<sup>+</sup> CD127<sup>high</sup> Zellen.

Der Durchfluss mit den CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>dim/-</sup> Tregs wurde für die anschließende MS-Säule verwendet. Bei einer Standard-Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen vor der LD-Säule wurde das Zell-Pellet mit MP auf 90µl verdünnt, ansonsten wurde das Endvolumen proportional angepasst. Auf ein 90µl Volumen wurden 10µl CD25 micorbeads gegeben und für 15min bei 4°C inkubiert. Danach wurden pro 10µl microbeads 2ml MP zugegeben, zentrifugiert (s.o. LD-Säule) und in 500 µl MP resuspendiert. Die Probe wurde auf die mit 500µl äquilibrte MACS-MS-Säule gegeben und die Säule dreimal mit je 500µl MP gewaschen. Die gebundenen CD25<sup>+</sup> Zellen ließen sich mit 1ml MP ablösen. Durchfluss und Eluat wurden zentrifugiert (s.o.) und die Zellzahl wurde bestimmt. LD Eluat und MS Durchfluß bildeten die Treg depletierte Fraktion und LD Durchfluß (negative Selektion) mit MS-Eluat (positive Selektion) die CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> Tregs.

### 3.7 CFSE-TREG-SUPPRESSIONSASSAY

*Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester* ist zunächst ein farb- und fluoreszenzloses Molekül, das passiv in Zellen diffundiert und dort an freie Amine von Proteinen bindet. Über das Abspalten von zwei Azetatgruppen durch Esterasen entsteht das fluoreszierende *Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester* (CFSE). Dieser Farbstoff ist sehr stabil, beeinträchtigt die Zelle aber nicht in ihrer Funktion. Bei Zellteilungen halbiert sich der CFSE Anteil (und die Fluoreszenzintensität) der einzelnen Zelle, sodass sich über die Fluoreszenzmessung im Durchflusszytometer die Proliferationsaktivität der Zellen nachverfolgen lässt. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um eine veränderte Proliferationsaktivität von Effektor T-Zellen in Anwesenheit von Tregs nachzuweisen.

Um eine Proliferation der T-Zellen zu induzieren, wurde anti-CD3 Antikörper benutzt, der wie ein MHC/Antigen-Komplex an den TCR/CD3 Komplex auf der Membran von T-Zellen bindet und ein polyklonaler Stimulus für die T-Zell Proliferation ist.

Für den CFSE-Treg-Suppressionsassay wurde die Treg-depletierte lymphozytäre

## Methoden

Fraktion aus Aszites bzw. peripherem Blut zunächst mit CFSE gelabelt. Nach Kokultur mit unterschiedlichen Treg-Konzentrationen wurde die Suppression der Proliferation der Treg-depletierten CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Zellen anhand der Anzahl CFSE<sup>+</sup> Zellen bestimmt.

Für das CFSE-Labeling wurden Treg-depletierte Zellen in ein 15ml Falcon-Tube pipettiert ( $5 \times 10^4$  Zellen pro geplanten Ansatz) und mit 5ml *CFSE Labeling Buffer (PBS / 0,1%BSA)* gewaschen (Zentrifugation: 300g, 10 min, RT). Unmittelbar vor dem Labeln wurde aus einer 5 mM CFSE-Stammlösung durch 1:100 Verdünnung in CFSE-Labeling Buffer eine 50µM CFSE-Working Solution hergestellt. Die Treg-depletierten Zellen wurden dann in *CFSE Labeling Buffer plus CFSE Workingsolution* resuspendiert (Pro  $1 \times 10^6$  Zellen 1ml *Buffer* + 20µl *Working Solution*). Die Gesamtverdünnung betrug somit 1:5000 und die CFSE Endkonzentration 1µM. Für das CFSE Labeling inkubierte die Probe 30 Min bei 37°C im Brutschrank. Es folgte ein Stoppen des Labelings über die Zugabe von kaltem Kulturmedium (RPMI/10%FCS in dreifachem Volumen des eingesetzten CFSE Labeling Buffers) und eine Inkubation über 5min auf Eis. Danach wurde mit 300g für 5min bei RT zentrifugiert und zweimal mit warmem Kulturmedium (je gleiches Volumen kaltes Medium) gewaschen. Je  $5 \times 10^4$  Zellen wurden in 50µl Medium aufgenommen. Einer der stimulierten Proben wurden zusätzlich zu 10% Tregs hinzugefügt, um deren Einfluss auf die Proliferation festzustellen. Bei Proben, bei denen ausreichende Zellzahlen von Tregs isoliert werden konnten, wurden zusätzlich Ansätze mit einer Treg Konzentration von 33% und 20% erstellt, um einen Dosis-Abhängigkeits-Effekt zu untersuchen. Die Treg-Tubes wurden nochmals zentrifugiert und mit 1-2ml Medium gewaschen.

Für die Stimulation wurde eine CD3-Beschichtung der Wells durchgeführt, in welche die Zellen später ausplattiert wurden. Das CD3 aus dem 0,5mg/ml Stock wurde zunächst 1:100 auf 5µg/ml verdünnt. In jedes Well wurden 100µl pipettiert und für 2 Stunden bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 150µl PBS pro Well waren die Wells mit CD3 beschichtet. Anschließend wurden pro Well (insgesamt 3-5)  $5 \times 10^4$  Zellen ausplattiert (Endvolumen je 100µl). Eine Probe blieb dabei zur Kontrolle komplett unstimuliert und wurde in ein nicht-beschichtetes Well ausplattiert. Es erfolgten zwei Waschschrte mit PBS.

## Methoden

Stimulationsansätze der drei Proben:

- Tube 1: unstim
- Tube 2: CD3 beschichtet (5µg/ml)
- Tube 3: CD3 beschichtet +Tregs 10:1 =  $5 \times 10^3$  Tregs (ggf. zusätzlich 5:1 und 2:1)

Die T-Zell-Proliferation mit und ohne Kokultur mit Tregs wurde nach drei Tagen Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> gemessen. Dafür wurden die Zellen geerntet, nachdem *10µl kaltes 20mM EDTA pro 100µl Ansatzvolumen* für 15min zugegeben worden war, um das Ablösen zu erleichtern. Danach konnten die Zellen über einmaliges Nachspülen mit PBS in je ein FACS-Röhrchen pipettiert werden.

Um zwischen den CD4+ und CD8+ Effektor T-Zellen zu unterscheiden, erfolgte als letzter Schritt des Versuchs die Oberflächenfärbung mit 2,5µl *anti-CD4 PeCy7* und 5µl *anti-CD8 APC*. Nach 20 minütiger Inkubation (4°C, im Dunkeln) und folgendem Auswaschen der Antikörper konnte die Proliferation der Proben im Durchflusszytometer bestimmt werden. Durch die Oberflächenfärbung war es möglich, die Ergebnisse so auch auf Unterschiede in der Proliferations-Suppression zwischen CD4 und CD8 T-Zellen zu untersuchen.

### 3.8 BESTIMMUNG VON TH17-ZELLEN UND EFFEKTOR T-ZELLEN IM ASZITES UND PERIPHEREM BLUT

Das qualitative Merkmal der TH17-Zellen ist die Produktion an IL-17. IL-17 wurde in CD4+ und CD8+ T-Zellen gemessen, um sowohl TH17 als auch Tc17 Zellen nachzuweisen. Die jeweilige Fähigkeit zur IFN $\gamma$ -Bildung wurde ebenfalls untersucht, um ein IFN $\gamma$  bildendes, intermediäres Subset zwischen TH17 und Tc17 Zellen zu identifizieren. Für eine bessere Nachweisbarkeit wurden die Zellen mit Phorbol ester (PMA) und Ionomycin die Zytokinproduktion stimuliert. PMA und Ionomycin wirken aktivierend auf Proteinkinasen. Die Verwendung von Golgi-Stop führte zu einem Arrest der Zytokine im Golgi-Apparat und damit zur intrazellulären Akkumulation und einer weiteren Steigerung der Fluoreszenzintensität bei der anschließenden FACS Messung.

Für die Bestimmung der IL-17 und IFN $\gamma$ -Expression in CD4+ und CD8+ peripheren bzw. peritonealen Lymphozyten wurde ein Aliquot der Treg-depletierten Zellen verwendet.



## Methoden

Die Zellen wurden in 24er Kulturplatten in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen in 500  $\mu$ l Kulturmedium ausplattiert.

Dazu wurde ein 24er Well mit 5  $\mu$ l PMA (Stock in Dimethylsulfoxid 1mg/ml, 1:100 verdünnt in Kulturmedium, Endkonzentration 100ng/ml) und 5  $\mu$ l Ionomycin (Stock in Dimethylsulfoxid 1mg/ml, 1:10 verdünnt in Kulturmedium, Endkonzentration 1  $\mu$ g/ml) stimuliert, während ein zweites 24er Well als unstimulierte Kontrolle diente. Im Anschluss wurde noch 0,5  $\mu$ l *Golgi-Plug* zu beiden Wells hinzupipettiert. Die Proben wurden anschließend für 4 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Alle anschließenden Arbeitsschritte wurden bei der stimulierten und unstimulierten Probe identisch durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen aus den Wells geerntet. Hierzu wurde je 50  $\mu$ l kaltes 20mM EDTA pro 500  $\mu$ l Ansatzvolumen hinzugegeben und für 15 Min einwirken gelassen. Danach konnten die Zellen über einmaliges Nachspülen mit PBS in je ein FACS-Röhrchen pipettiert werden.

Anschließend wurden die Zellen mit 1ml *Staining-Buffer* (PBS+1% FCS) bei 500g für 5 Min gewaschen. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Zelloberfläche zu vermeiden, wurde ein Fc-Block durchgeführt. Hierfür wurden 50  $\mu$ l *mouse IgG* (Stock 11,3 mg/ml, 1:100 in Staining-Buffer verdünnt) in die FACS-Röhrchen pipettiert. Nach 15 minütiger Inkubation bei 4°C wurde die Oberflächenfärbung ohne vorheriges Waschen durchgeführt: In beide FACS-Röhrchen wurden 5  $\mu$ l *CD4 PE Cy7* und 2  $\mu$ l *CD8 APC* pipettiert, die Proben für 30 Min bei 4°C inkubiert und anschließend nach oben genanntem Schema gewaschen.

Danach konnte die intrazelluläre Färbung, wie beim TAM Phänotyping (s.o.) begonnen werden (BD Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit with Golgi Plug). Nach der Permeabilisierung erfolgte die intrazelluläre Färbung der Zytokine mit 0,5  $\mu$ l *IFN- $\gamma$  FITC* (0,5mg/ml) und 1  $\mu$ l *IL-17A PE* (50  $\mu$ g/ml). Die Konzentration von IL-17, IFN $\gamma$ , CD4 und CD8 wurde anschließend durch FACS gemessen.

### 3.9 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE

#### 3.9.1 Theoretische Grundlagen

Durch die Methode des „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) lassen sich Zellen auf ihre Größe und molekulare Beschaffenheit hin untersuchen. Die Bestimmung erfolgt auf Einzelzellniveau durch optische Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenz nach spezifischer Zellfärbung.

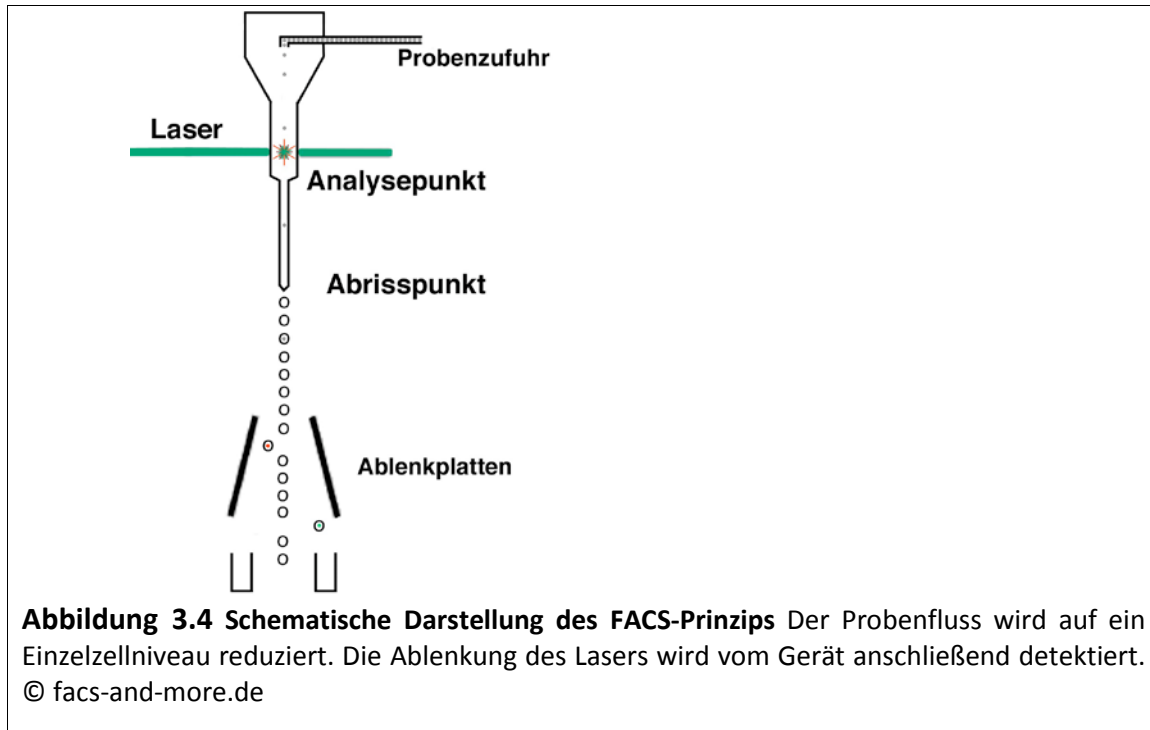
Bei der Methode wird der Probenstrom hydrodynamisch fokussiert und anschließend rechtwinklig an einem Laser vorbeigeführt. Trifft der Laser auf eine Zelle, so wird er durch die Zellbeschaffenheit unterschiedlich stark abgelenkt. Man unterscheidet hierbei die Vorwärtslichtstreuung oder „forward scatter“ (FSC) von der Seitwärtslichtstreuung oder „side scatter“ (SSC). Die FSC beschreibt den in einem kleinen Winkel abgelenkten Laserstrahl, der zur Bestimmung der Zellgröße und des Volumens interpretiert werden kann. Demgegenüber wird die SSC eher rechtwinklig abgelenkt, je stärker die Zelle granuliert ist, und beschreibt somit quantitativ den Zellinhalt. Färbt man in der Zelle spezifische Strukturen, wie zum Beispiel Rezeptoren oder Proteine, mit Fluorochromen an, so werden diese durch Laser zur Photonenemission angeregt. Das Fluoreszenzlicht lässt sich anschließend ebenfalls messen.

Die Daten werden automatisch von einem Computer erfasst und können nach dem Erreichen einer statistisch befriedigenden Quantität bewertet werden. Durch die digitale Form wird eine sehr hohe Modifizierung der Daten ermöglicht, sodass sich molekulare Zelleigenschaften sehr spezifisch darstellen lassen, wie in dieser Arbeit logarithmisch in einem Koordinatensystem.

In dieser Arbeit wurde das FACSCalibur von BD verwendet, das über zwei Laser unterschiedlicher Wellenlänge verfügt. Der erste Laser, ein blauer Argon-Ion Laser, lässt die Detektion von FSC, SSC und drei Fluoreszenzspektren zu. Über einen zusätzlichen roten Laser lassen sich die Emissionen von einem weiteren Spektrum detektieren, sodass bei den Versuchen vier verschiedene Fluorochrome eingesetzt

## Methoden

werden konnten, wodurch in der Charakterisierung von einzelnen Populationen ein hohes Maß an Differenzierung erreicht wurde (Abbildung 3.4).



### 3.9.2 Geräteeinstellung, Messung und Auswertung

Zur Messung und Auswertung wurde das FACS Gerät mit der Software *CellQuestPro* verwendet. Anhand von Isotypen-Kontrollen (Treg-, TAM Phänotypisierung) oder unstimulierten Background-Kontrollen (IL-17 Phänotypisierung; CFSE Proliferationsessay) wurden für die Messung erstellte Standardeinstellungen verwendet.

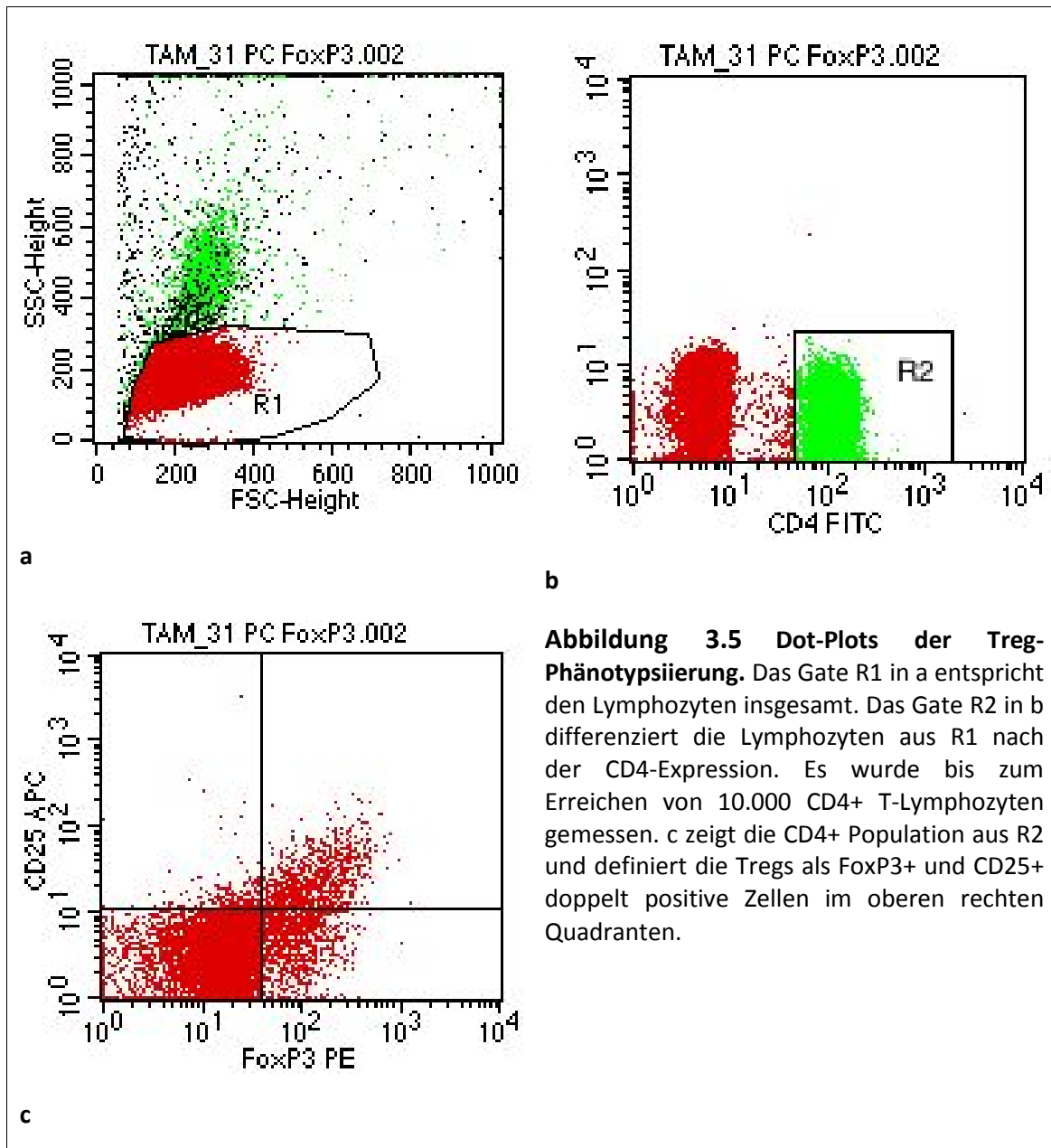
### 3.9.3 Treg Phänotypisierung

Die Einstellungen für die Messung wurden gemäß einer Isotypenkontrolle vorgenommen. Die Lymphozytenpopulation wurde aufgrund ihrer Größe im FSC/SSC DotBlot als Gate R1 identifiziert.

Die als R1 definierten Zellen wurden daraufhin in einem weiteren Plot nach der Expressionshöhe von CD4 aufgetragen. Die CD4+ Lymphozytenpopulation wurde durch ein weiteres Gate (R2) definiert. Es wurden 10.000 CD4+ T-Lymphozyten gemessen.

## Methoden

Zur Identifikation der Tregs wurden die CD4<sup>+</sup> Lymphozyten (Kombination aus den Gates R1 und R2) in einem dritten Plot nach FoxP3 und CD25 aufgetragen und anhand der Isotypenkontrolle in Quadranten eingeteilt. Die Software errechnet den prozentualen Anteil der Zellen im jeweiligen Quadranten an der CD4<sup>+</sup> Population (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5 Dot-Plots der Treg-Phänotypisierung.** Das Gate R1 in a entspricht den Lymphozyten insgesamt. Das Gate R2 in b differenziert die Lymphozyten aus R1 nach der CD4-Expression. Es wurde bis zum Erreichen von 10.000 CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten gemessen. c zeigt die CD4<sup>+</sup> Population aus R2 und definiert die Tregs als FoxP3<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup> doppelt positive Zellen im oberen rechten Quadranten.

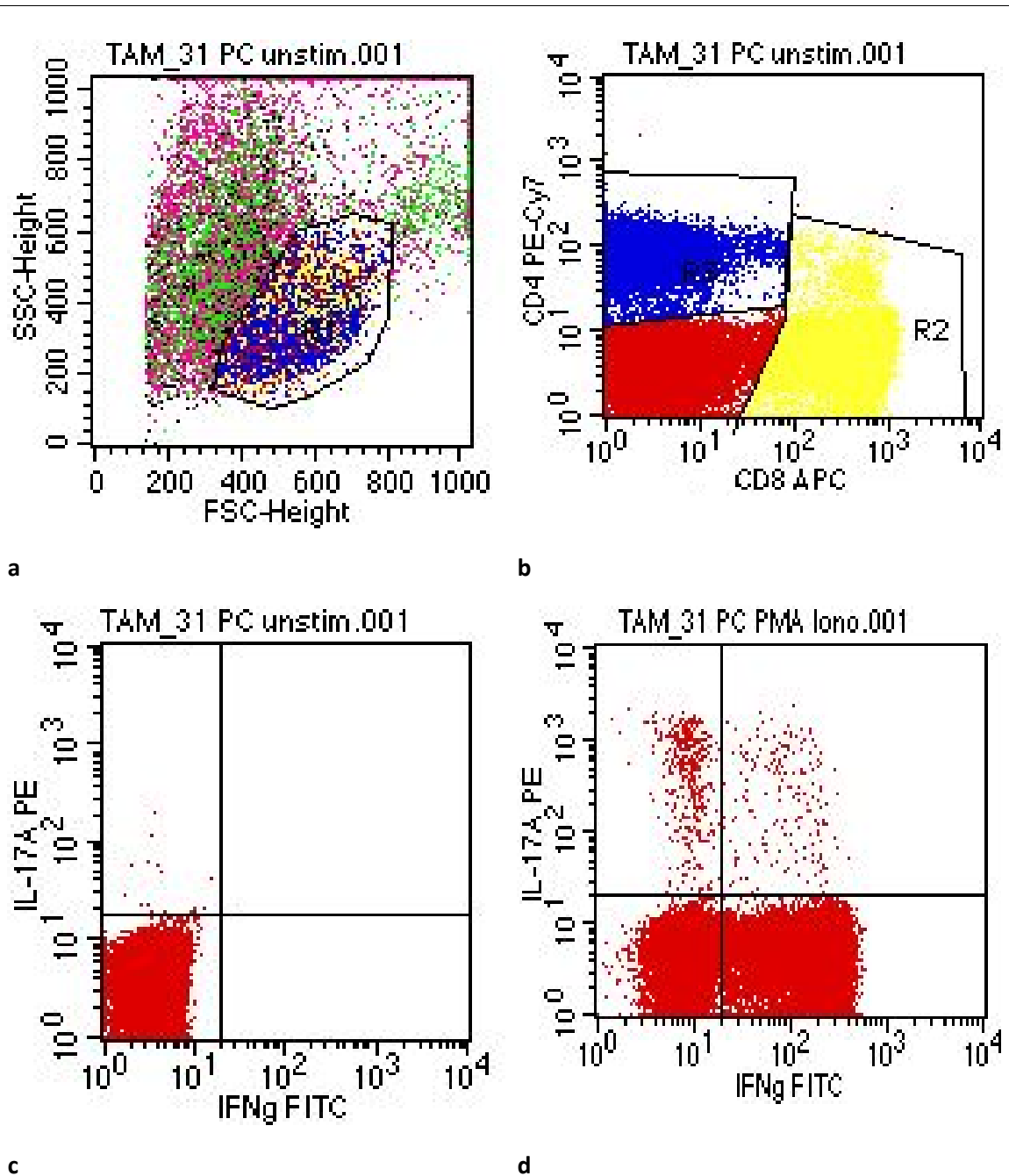
### 3.9.4 TH17 Phänotypisierung

Die Einstellungen in der Auswertung wurden zunächst anhand der unstimulierten Probe festgelegt und anschließend auf die stimulierte Probe übertragen. Analog zur

## Methoden

Treg Phänotypsierung erfolgt die Bestimmung der Lymphozytenpopulation durch das R1 Gate bis zur Erfassung von 100.000 Zellen im R1 Gate. In einem folgenden Plot wurden die Zellen aus R1 gegen CD8 und CD4 aufgetragen. Die stark CD8+ Zellen erfasste das Gate R2, die stark CD4+ Zellen das Gate R3. Anhand der fehlenden Expression der intrazellulären Marker IL-17 und IFN $\gamma$  konnte anschließend in der unstimulierten Probe die Normalpopulation als Quadrant definiert werden. Für eine statistische Signifikanz wurde ein Background von <0,05% gewählt. CD4+ und CD8+ Zellen wurden in separaten Plots ausgewertet. Nach der Übertragung des Quadranten der unstimulierten auf die stimulierte Probe zeigten sich IL-17+- (oben links), IFN $\gamma$ +- (unten rechts) und IL-17+ IFN $\gamma$ +- Zellen (oben rechts).

Die Software erstellte automatisch eine individuelle Statistik für die Graphen von CD4 (R3) und CD8 (R2) der stimulierten abzüglich der unstimulierten Probe (Abbildung 3.6 a-d).



**Abbildung 3.6 Auswertung der TH17 Phänotypisierung.** CFC-Auswertung einer unstimulierten Probe im Vergleich zur stimulierten Probe. Erfassung der Lymphozytenpopulation in **a**. Die in **b** als R2 definierten CD8<sup>+</sup> Zellen werden in **c** dargestellt. **d** zeigt das Ergebnis bei einer stimulierten Probe. Die in **c** definierten Quadranten wurden auf die stimulierte Probe (**d**) übertragen. Dort zeigt sich die erhöhte Expression von IL-17 und IFN $\gamma$ .

### 3.9.5 CFSE Proliferationsassay

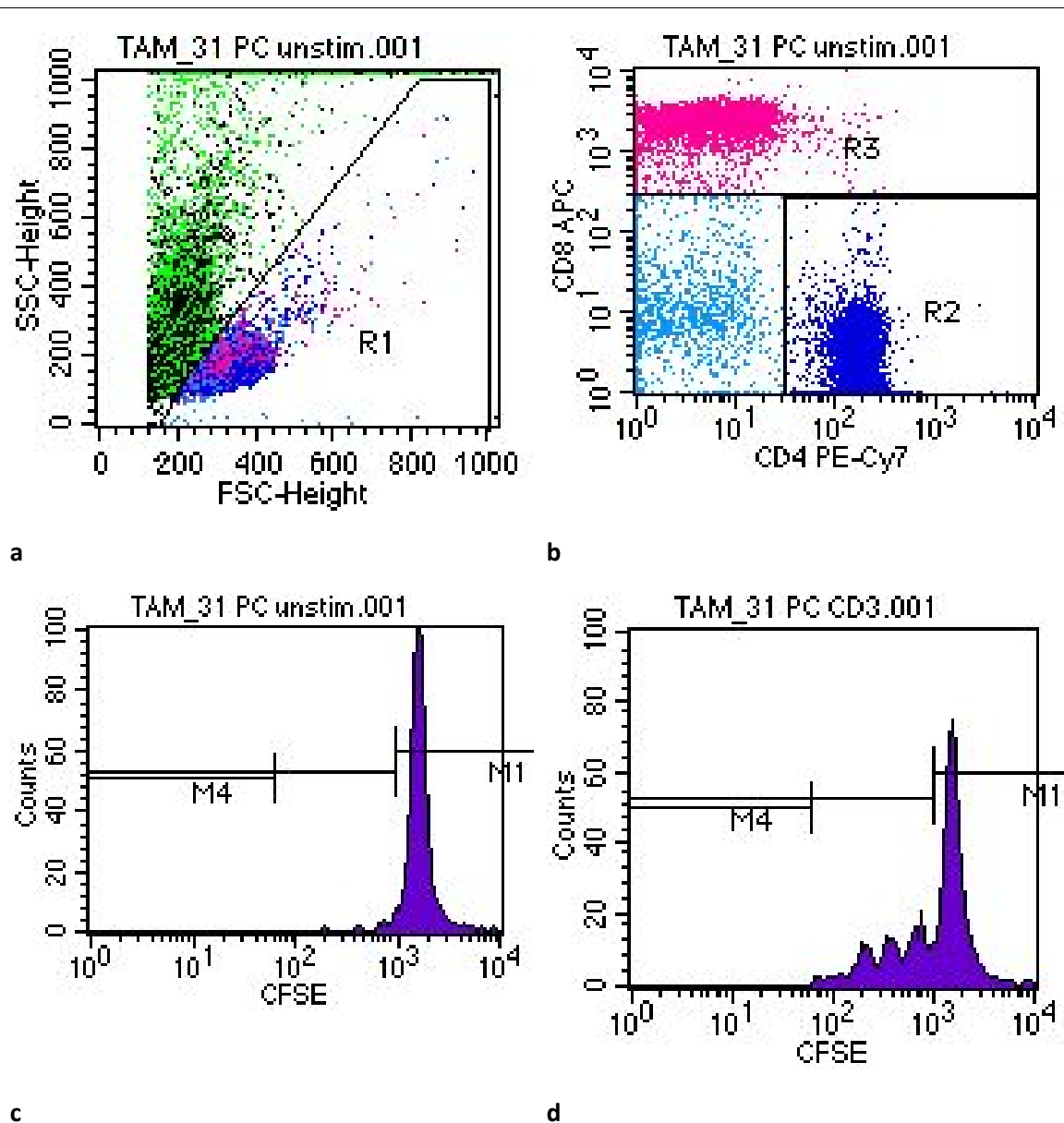
Ähnlich dem Ablauf bei der TH17 Phänotypisierung wurden die Einstellungen in der Auswertung anhand der unstimulierten Probe erstellt und dann in die stimulierte Proben kopiert. Der FSC/SSC DotPlot unterscheidet sich von den anderen Versuchen,

## Methoden

da die Zellen über mehrere Tage inkubiert worden sind und die Lymphozyten dadurch blastös werden. Demzufolge musste R1 wesentlich größer gewählt werden. Wie auch bei der TH17 Phänotypisierung wurden anhand der unstimulierten Probe die CD4+- und die CD8+-Zellen aus R1 in zwei weiteren Gates (R2 und R3) erfasst.

Die CD4+- und die CD8+-Zellen aus R2 bzw. R3 wurden in einem Histogramm nach der Expression von CFSE und nach ihrer Anzahl aufgetragen. Gemäß ihrer Proliferation bilden die Zellen *peaks* und lassen sich somit differenzieren.

In M4 wurden die Tregs, in M1 die unstimuliert proliferierenden Zellen ausgeschlossen. Die Software *CellQuestPro* berechnet die Zellzahl im Background der einzelnen Proben. Der Background der stimulierten Probe abzüglich der unstimulierten Probe beschreibt die durch anti-CD3-Antikörper zur Proliferation angeregten nativen T-Zellen. Die dazu berechnete prozentuale Differenz des Backgrounds bei Proben mit Tregs stellt die Inhibition dar (Abbildung 3.7 a-d).



**Abbildung 3.7 Beispiel für ein CFSE Dot- und ein Histogramm-Plot.** Zur Bestimmung der Lymphozytenpopulation wurde anhand der Isotypenkontrolle ein großes Gate (R1) gewählt (a). Im folgenden Dot-Plot (b) konnten die CD4<sup>+</sup> Population in R2 und die CD8<sup>+</sup> Population in R3 differenziert werden. Bei Proliferation halbiert sich die CFSE Fluoreszenz pro Zelle durch Mitose. c zeigt eine unstimulierte Probe mit intensiver Fluoreszenz der einzelnen Zellen. d zeigt bei einer stimulierten Probe mehr Fluoreszenz im Background, dafür einen niedrigeren Peak in M1. M4 enthält die Tregs und M1 die unstimuliert proliferierenden Zellen.



### 3.9.6 TAM Phänotypisierung und MDSCs

Die Daten der FACS-Messung mit den Versuchsergebnissen aus der Studie „Rolle von Peroxisome-Proliferator-activated Receptors  $\beta/\delta$  (PARP $\beta/\delta$ ) in der Aktivierung TAM von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom“ (Positives Ethikvotum vom 21-12-2010; Az: 205/10 liegt vor) standen zur Interpretation zur Verfügung. Für die Analyse wurde eine Kombination aus R1 (Lymphozytengate im FSC/SSC) und R2 (Gate CD14+ Zellen für TAM-Phenotypisierung bzw. Gate CD14- Zellen für MDSC-Phenotypisierung) gewählt. Die Messschwelle betrug 10000 Events in Gate R1.

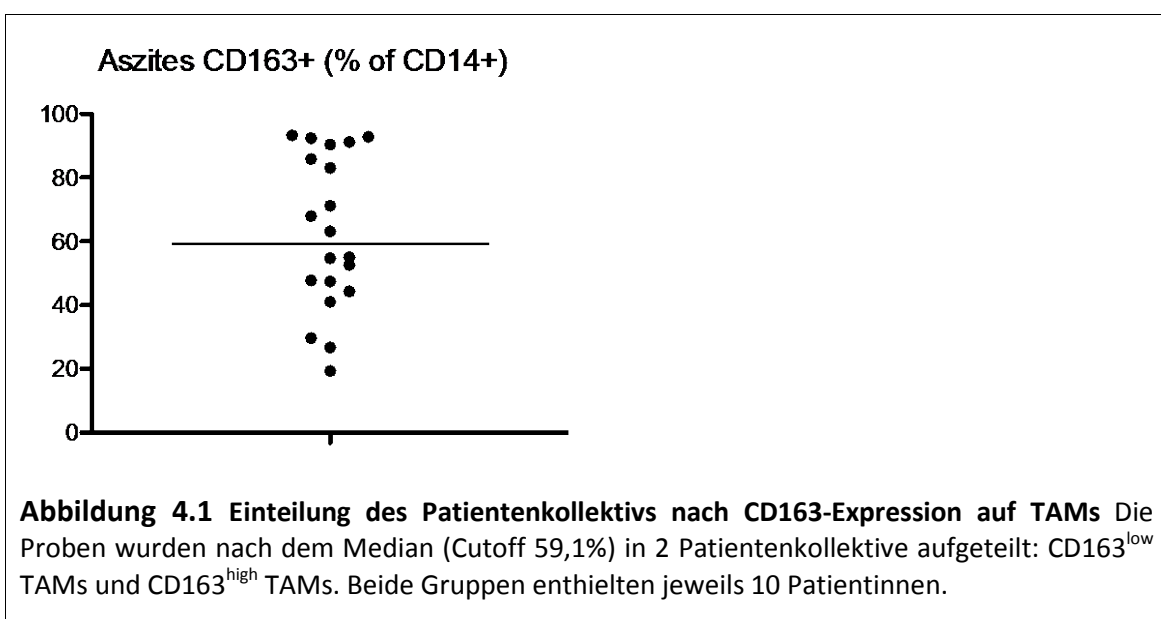
### 3.10 STATISTIK

Die Statistik wurde mit Hilfe der Programme Prism und Microsoft Excel durchgeführt. Für Korrelationen wurde der Test nach *Pearson* angewandt. Auf Normalverteilung wurde nach *D'Agostino und Pearson* getestet. Die Signifikanzberechnung erfolgte bei normalverteilten Daten durch den *gepaarten T-Test* und bei nicht normalverteilten Daten durch den *Wilcoxon matched pairs test*. Als statistisch signifikant wurde ein P-Wert von  $<0,05$  betrachtet.

## 4 ERGEBNISTEIL

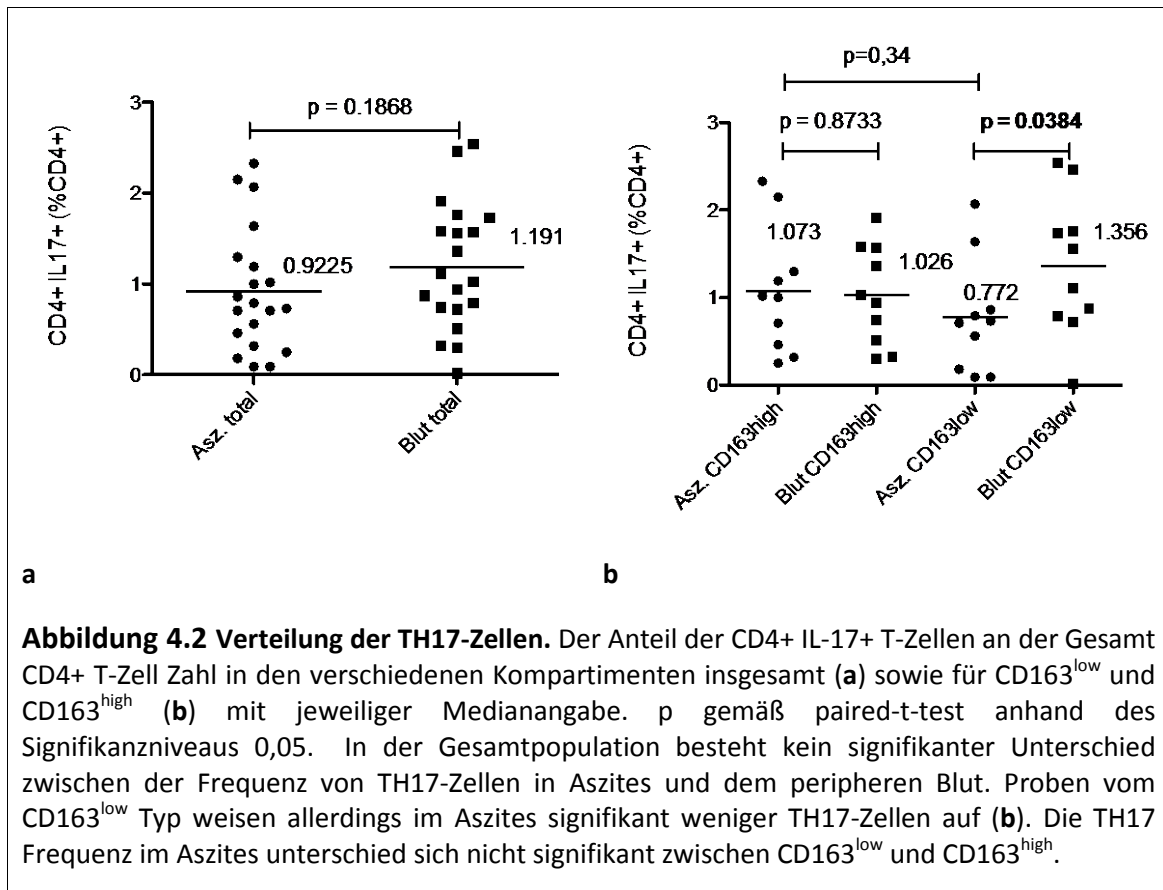
### 4.1 CHARAKTERISIERUNG UND SUBGRUPPENANALYSE VON TH17-ZELLEN

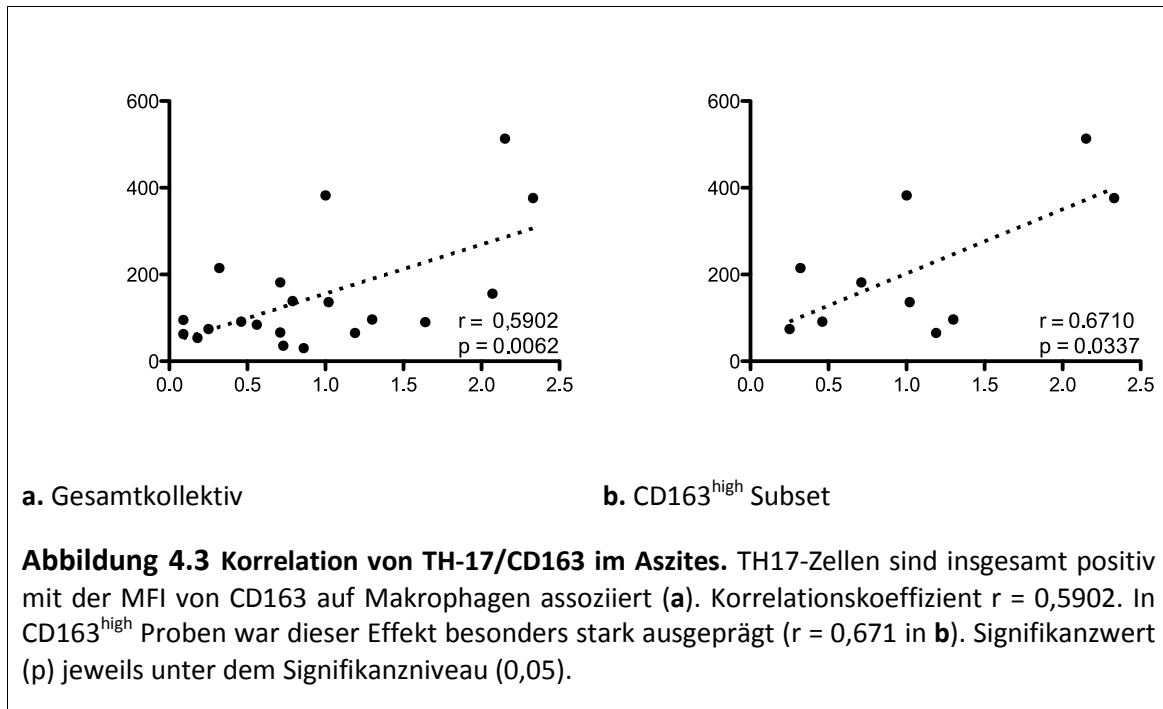
Zunächst wurde untersucht, ob sich beim Gesamtkollektiv die Frequenz an TH17-Zellen im Aszites und peripheren Blut signifikant unterscheidet. Die Daten wurden statistisch mit dem *paired-t-test* analysiert und anhand eines Signifikanzniveaus von  $p < 0,05$  geprüft. Des Weiteren wurde analysiert, ob Unterschiede in der TH17- Frequenz abhängig von dem im Aszites vorherrschenden TAM-Phänotyp auftreten. Basierend auf bereits publizierten Ergebnissen der Arbeitsgruppe besteht eine signifikante, inverse Korrelation zwischen progressionsfreiem Intervall und Oberflächenexpression von CD163 (hemoglobin/haptoglobin scavenger receptor) auf TAMs im Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen. Diese Assoziation besteht jedoch nicht in Bezug auf andere M2-Polarisierungsmarker wie z.B. CD206, CD32, CD64, CD16, HLA-DR, CCR7 oder der intrazellulären IL-10/IL-12-Ratio (Reinartz et al., 2013). Aufgrund dessen wurde im Rahmen einer Subgruppenanalyse die TH17-Frequenz in Abhängigkeit von CD163<sup>low</sup> und CD163<sup>high</sup> TAMs untersucht. Die Einteilung in die CD163<sup>low</sup>/ CD163<sup>high</sup> Subgruppen erfolgte anhand des Medians der CD163-Expression auf CD14+ TAMs innerhalb des Kollektivs (*cut-off*: 59,1%, Abbildung 4.1, siehe auch Tab. 2.1 Patientencharakteristika).



Für das Gesamtkollektiv konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Frequenz CD4+IL-17+ TH17-Zellen im Tumormilieu und im peripheren Blut nachgewiesen werden. Im Rahmen der Subgruppenanalyse zeigte sich jedoch, dass bei Patientinnen mit CD163<sup>low</sup> TAMs die Frequenz von TH17-Zellen im peripheren Blut signifikant höher als im Aszites war ( $p=0,0384$ ; Abbildung 4.2b). Zwischen den Proben mit CD163<sup>low</sup> und CD163<sup>high</sup> TAMs untereinander bestand weder im Aszites noch im peripheren Blut ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der TH17-Zellen.

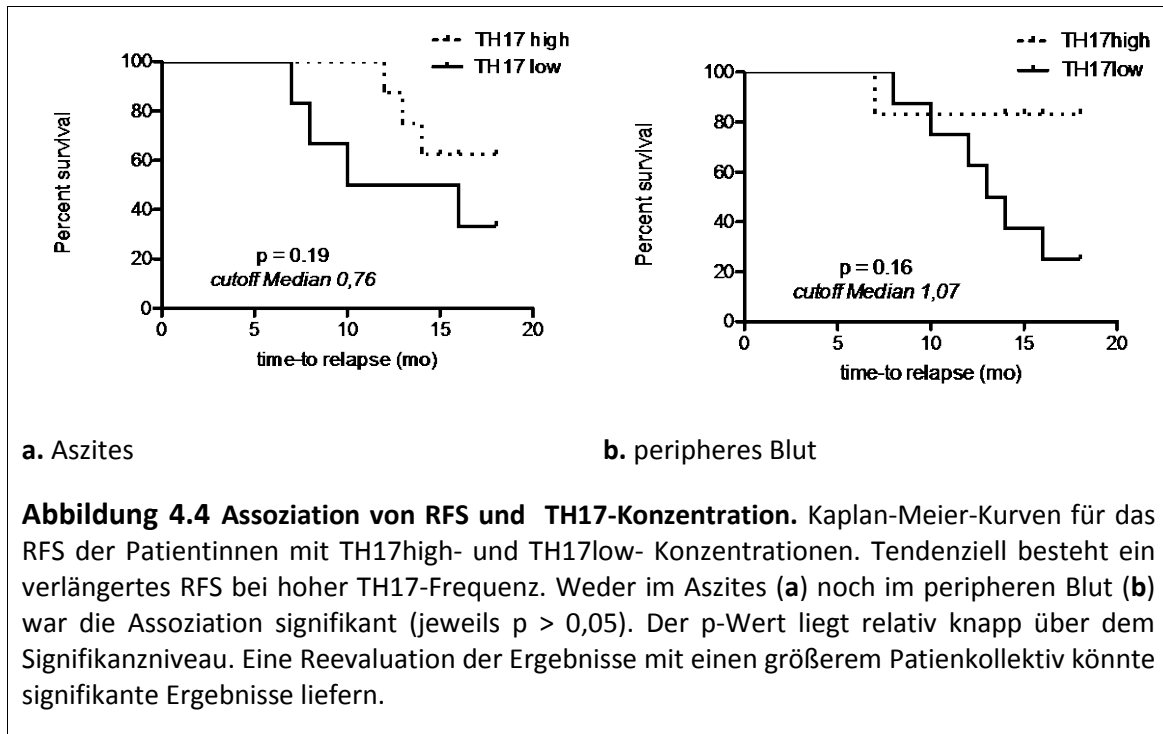
Insgesamt korrelierten die TH17-Zellen positiv mit der MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) von CD163 ( $r=0,59$ ). Bei den CD163<sup>low</sup> Proben war diese Beobachtung nicht signifikant (Daten nicht dargestellt), während die Korrelation bei den CD163<sup>high</sup> Proben stark ausgeprägt war ( $r=0,67$ ; Abbildung 4.3a, b).





#### 4.2 KLINISCHE RESPONSE BEI TH17-ZELLEN

Es wurden Survivalanalysen anhand der TH17 Daten und des progressionsfreien Überlebens der Patientinnen im *follow-up* durchgeführt. Die Proben aus Aszites und peripherem Blut wurden je in TH17<sup>high</sup> oder TH17<sup>low</sup> eingeteilt (*cutoff-Wert*: Median 0,76 % CD4+IL-17+ im Aszites und 1,07 % CD4+IL-17+ im peripheren Blut). 6 der 20 Probanden konnten wegen tumorunabhängigem Todesfalles, neoadjuvanter Chemotherapie oder extremer Varianzen der Makrophagenmarker im Vergleich zum Gesamtkollektiv nicht in die Analysen inkludiert werden (s. Tab. 2.1). Das progressionsfreie Überleben (RFS) wurde bis zum Endpunkt (Juli 2013) in Monaten gemessen und in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Diese wurden dann über einen Log-rank (Mantel-Cox) Test auf Signifikanz geprüft. Weder im Aszites noch in peripherem Blut konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem RFS und dem prozentualen Level an TH17-Zellen aufgezeigt werden. Angesichts des kleinen Kollektivs bei einer großen Anzahl zensierter Events war keine signifikante Assoziation zu erwarten. Tendenziell besteht ein verbessertes RFS bei Proben mit hoher TH17-Frequenz. Dieses Ergebnis sollte in größer angelegten Studien spezifiziert werden. (Abbildung4.4 a,b).

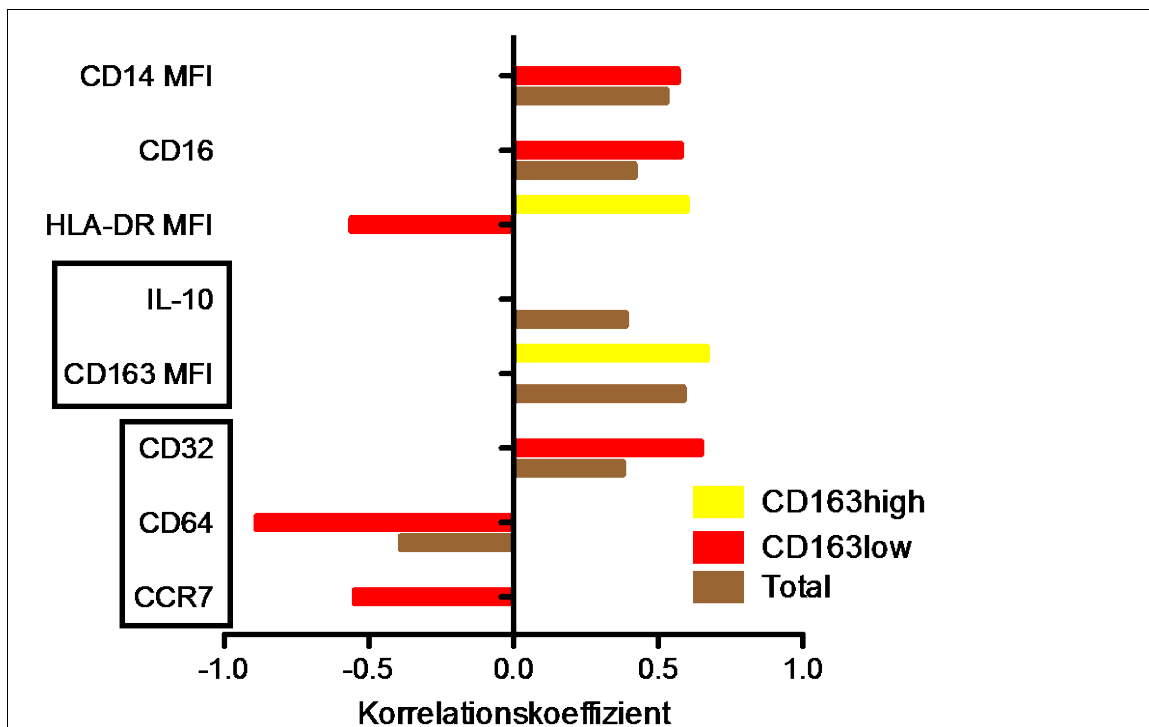


#### 4.3 ASSOZIATIONEN ZWISCHEN TH17-ZELLEN UND TAM-POLARISIERUNGSMARKERN

Obwohl zunächst kein signifikanter Unterschied in der TH-17 Frequenz in CD163<sup>low</sup> und CD163<sup>high</sup> Proben im Aszites nachgewiesen werden konnte, ist es denkbar, dass die Expression anderer TAM-assoziiierter Marker die TH17-Rekrutierung oder -Differenzierung beeinflusst. Aus diesem Grund wurden auch andere TAM-Polarisierungsmarker im Hinblick auf die TH17-Population untersucht – auch wenn die Expression dieser Marker bis auf IL-6 und IL-10 bisher keine prognostische Relevanz beim Ovarialkarzinom gezeigt hatte (Reinartz et al. 2013). Analysiert wurden in diesem Zusammenhang neben CD163 die klassischen M1/M2-Polarisierungsmarker CD206, IL-10, IL-12, CCR7, die Fc-Rezeptoren CD16, CD32 (low affinity FcR) und CD64 (high affinity FcR) und das in der Antigenpräsentation involvierte Moleküle HLA-DR. Die Korrelation mit dem TH17-Subset wurde entweder zur prozentualen positiven Expression oder zu der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der TAM-Marker im FACS bestimmt.

Auffällig war, dass sich in dem CD163<sup>low</sup> Patientenkollektiv eine häufigere Korrelation zwischen Makrophagenmarkern und der Frequenz von TH17-Zellen feststellen ließ als im CD163<sup>high</sup> Kollektiv. Positive Korrelationen bestanden im Aszites zu dem low affinity FcR CD32, CD16 und CD14 sowie negative zu CCR7, HLA-DR und high-affinity FcR CD64 Zellen (Abbildung 4.5). Im CD163<sup>high</sup> Patientenkollektiv war HLA-DR hingegen positiv mit der TH17-Frequenz korreliert, genauso wie CD163.

Das Gesamtkollektiv entsprach in schwächerer Ausprägung den Korrelationen zu CD14, CD16, CD32 und CD64 im CD163<sup>low</sup> Subset sowie CD163 im CD163<sup>high</sup> Subset. Es bestand darüber hinaus eine schwach positive Korrelation zu IL-10.

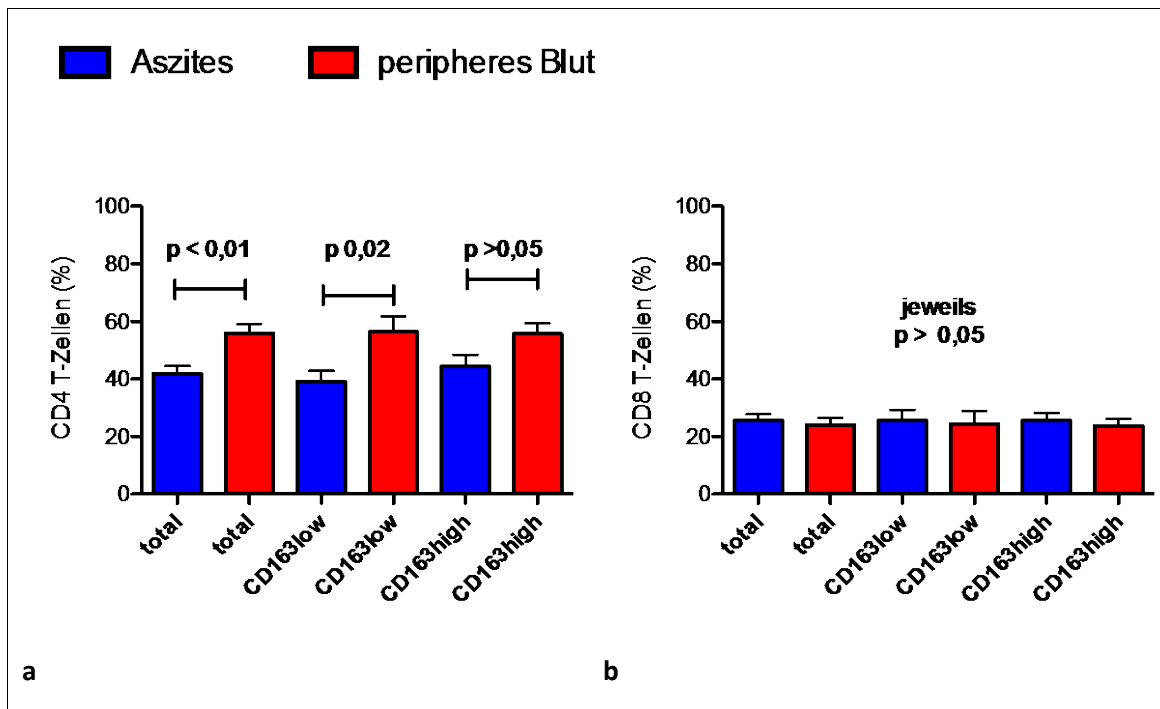


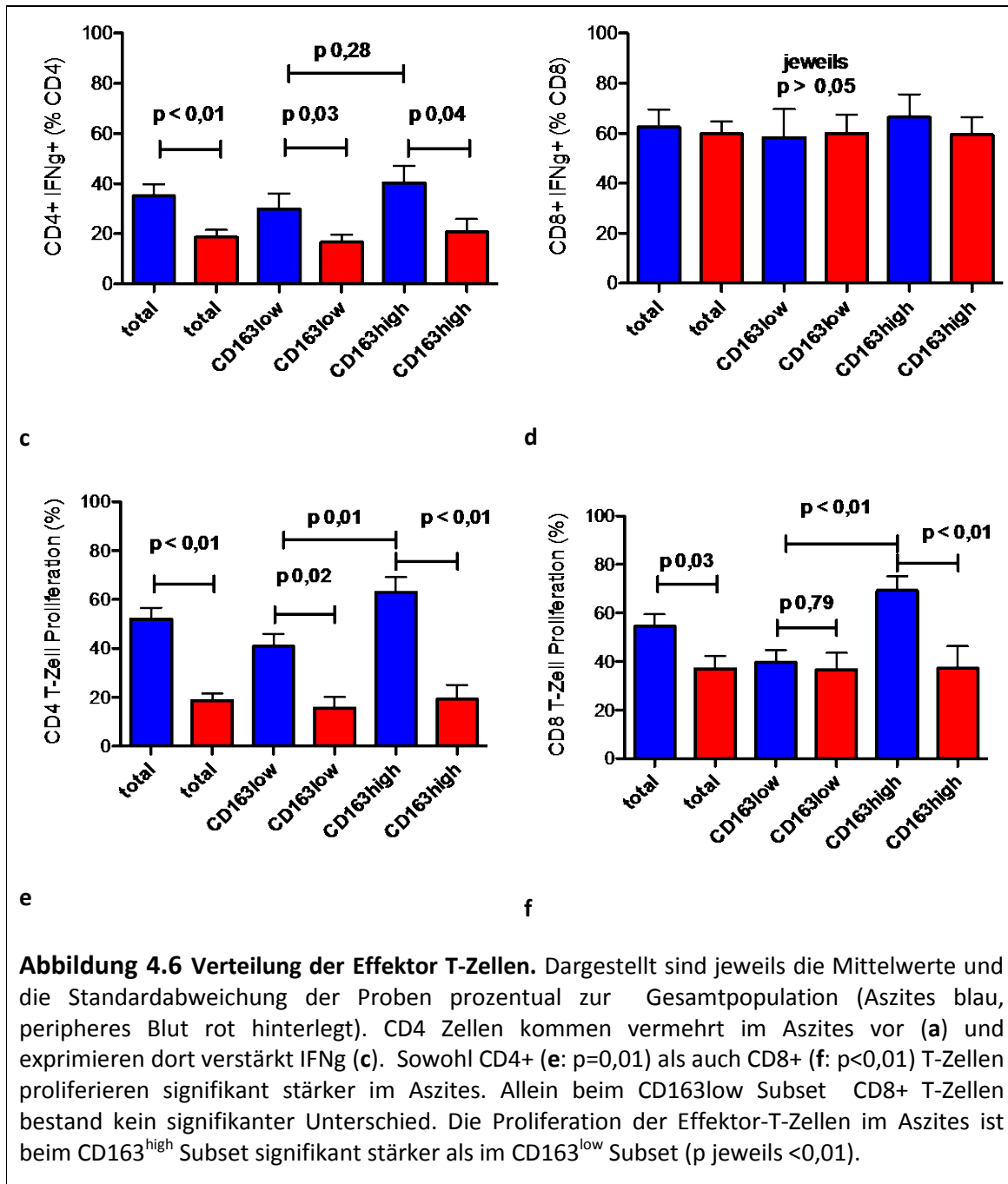
**Abbildung 4.5 Korrelation von TH17-Zellen und Makrophagenmarkern.** Korrelation einzelner TAM-Marker zur TH17 Frequenz. Korrelationen im CD163<sup>high</sup> Subset sind gelb, CD163<sup>low</sup> Subset sind rot und das Gesamtkollektiv ist braun dargestellt. Alle Korrelationskoeffizienten sind signifikant gemäß paired-t-test (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ). Typische M1 Marker sind IL-10 und CD163. Es bestehen positive Korrelationen zum Gesamtkollektiv. Typische M2 Marker sind CD32, CD64 und CCR7. Bis auf CD32 bestehen negative Korrelationen zur TH17 Frequenz. Die Assoziationen unterscheiden sich zwischen dem CD163<sup>low</sup> und dem CD163<sup>high</sup> Subset: TH17-Zellen haben in den verschiedenen Subsets gegensätzliche Assoziationen zu HLA-DR: Im CD163<sup>high</sup> Subset wirken sie sich positiv und im CD163<sup>low</sup> Subset negativ auf die Expression aus. Im CD163<sup>low</sup> Subset sind TH17-Zellen mit auffällig vielen Makrophagenmarkern assoziiert.

#### 4.4 ANALYSE VON EFFEKTOR T-ZELLEN IM ASZITES UND PERIPHEREM BLUT

Auch für die Effektor T-Zellen wurden Unterschiede zwischen Aszites und peripherem Blut analysiert. Neben der Gesamtpopulation an CD4+ und CD8+ T-Zellen wurde zusätzlich das jeweilige Effektorpotential anhand der Expression von IFN $\gamma$  nach mitogenem Stimulus und der Proliferationskapazität nach CD3-Stimulus untersucht.

Die CD8+ T-Zellen machten in beiden Kompartimenten etwa ein Viertel der Leukozyten aus, wobei sich die Verteilung nicht zwischen den CD163 Subgruppen unterschied. Deutlich häufiger in der Leukozytenpopulation waren CD4+ T-Zellen, deren - Anteil im peripheren Blut mit 56% gegenüber ca. 40% im Aszites signifikant höher war. Dieser Unterschied spiegelte sich auch in den CD163 Subgruppen wider, die somit der Gesamtpopulation entsprachen (Abbildung 4.6a-f).





Betrachtet man die IFN $\gamma$ -Expression von CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen als Effektorzellmerkmal, so zeigt sich eine signifikante Zunahme an CD4+ IFN $\gamma$ + Effektor-T-Zellen im Aszites im Vergleich zum peripheren Blut, während die Expression von IFN $\gamma$ + auf CD8+ T-Zellen im Aszites der im peripheren Blut entsprach. Eine weitere Subgruppenanalyse der Patientinnen mit CD163<sup>low</sup> versus CD163<sup>high</sup> TAMs ergab, dass die signifikanten Unterschiede in der Frequenz CD4+ IFN $\gamma$ + Effektor-T-Zellen zwischen Aszites und peripherem Blut in beiden Subgruppen gleichermaßen bestehen.



Neben der IFN $\gamma$ -Expression wurde auch die proliferative Kapazität von T-Zellen nach polyklonalem Stimulus mit CD3-Antikörper als Effektormerkmal untersucht. Effektor T-Zellen proliferierten insgesamt im Aszites stärker als im peripheren Blut. Dieser Unterschied war jeweils im CD163<sup>high</sup> Kollektiv stärker ausgeprägt als im CD163<sup>low</sup> Subset. Nur im CD163<sup>low</sup> Subset bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der CD8+ T-Zell Proliferation in Aszites und Peripherie.

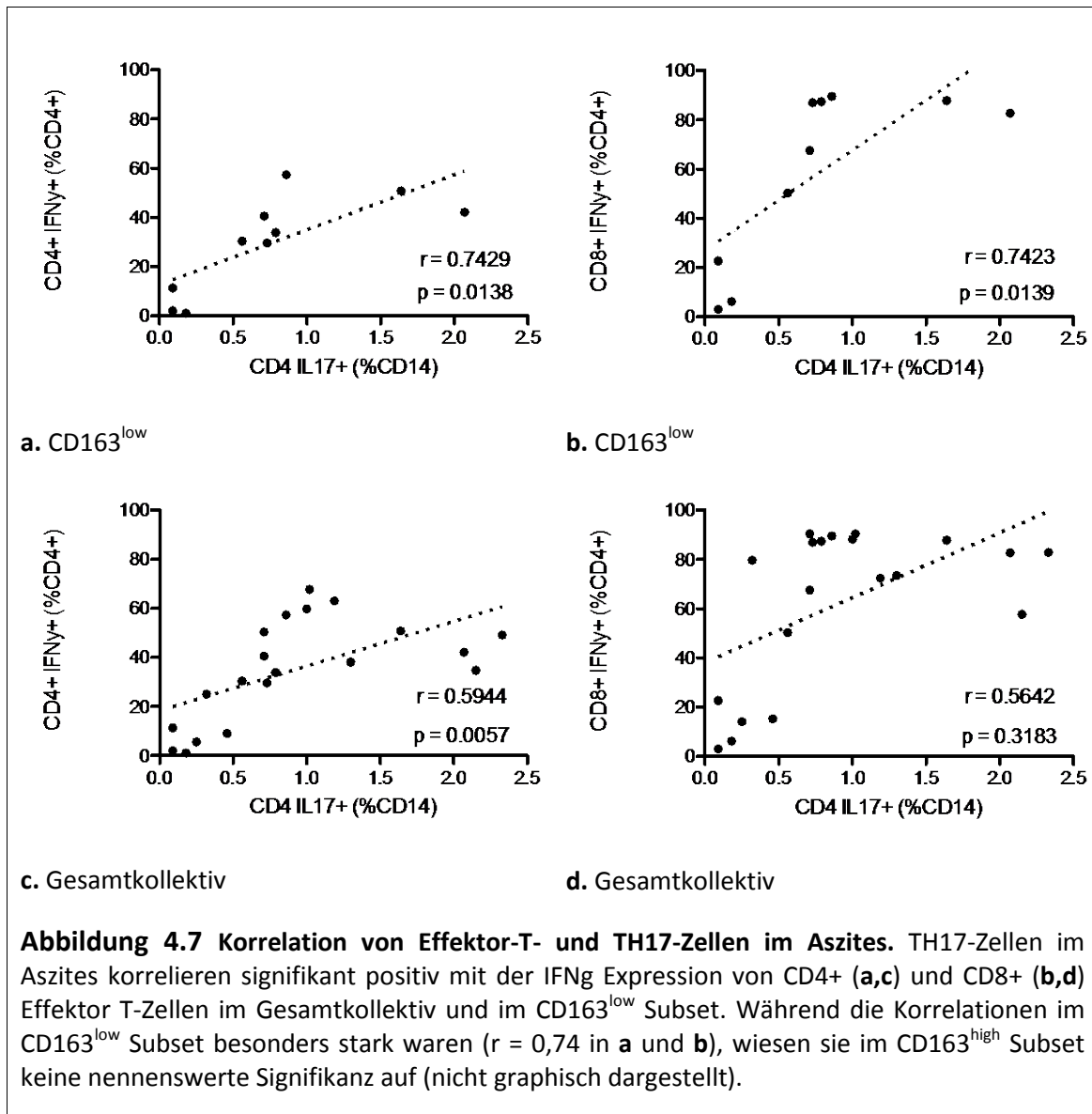
#### 4.5 KORRELATIVE TH17- UND EFFEKTOR-T-ZELL UNTERSUCHUNG

Das Vorkommen von TH17-Zellen wurde mit den T-Zell-Effektorfunktionen im jeweiligen Kompartiment (peripheres Blut versus Aszites) verglichen, um zu untersuchen, ob TH17-Zellen das Auftreten von Effektor-T-Zellen, die möglicherweise anti-tumorale Eigenschaften aufweisen, begünstigen oder nicht. Die CD4+ und CD8+ Effektor-T-Zellen wurden zum einen über die IFN $\gamma$ -Expression nach mitogenem Stimulus und zum anderen über die proliferative Kapazität nach polyklonalem Stimulus mit anti-CD3 Antikörper charakterisiert.

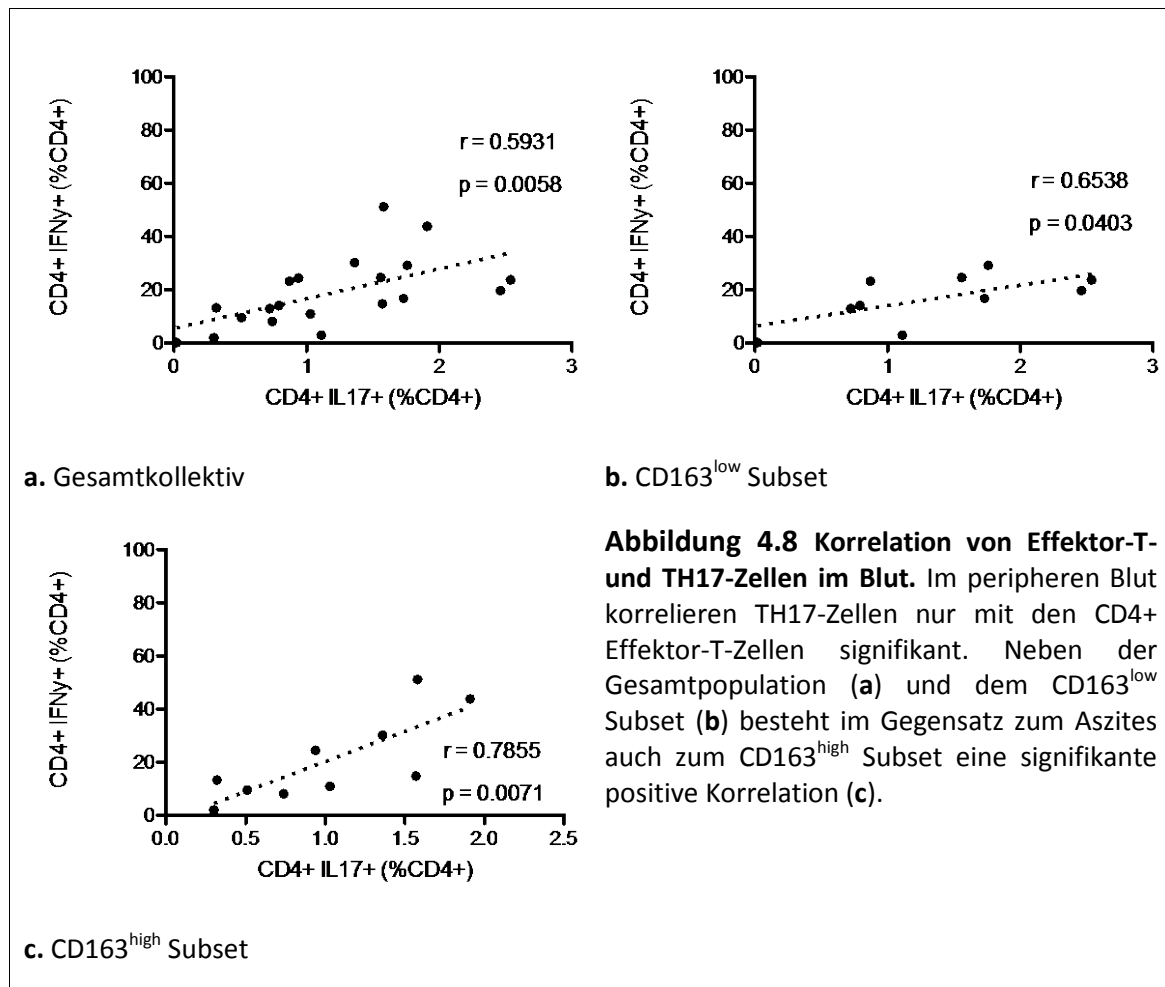
Wie Tabelle 4.1 zeigt, konnten im Aszites für das Gesamtkollektiv positive Korrelationen zwischen TH17-Zellen und der IFN $\gamma$ -Expression in CD4+ und CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden. Im CD163<sup>low</sup> Subset korrelierte die Präsenz an TH17-Zellen besonders stark mit dem Anteil an IFN $\gamma$ + CD4+ ( $r=0,74$ ) und IFN $\gamma$ + CD8+ Effektor-T-Zellen ( $r=0,74$ ). Für das CD163<sup>high</sup> Subset ergaben sich keine signifikanten Korrelationen (Abbildung 4.7a-d).

	CD4+IL-17+			
	total	CD163 <sup>low</sup>	CD163 <sup>high</sup>	
CD4+ IFN $\gamma$ + Aszites	0,59	0,74	ns	Korrelations koeffizient
CD8+ IFN $\gamma$ + Aszites	0,56	0,74	ns	
CD4+ IFN $\gamma$ + Blut	0,59	0,65	0,79	
CD8+ IFN $\gamma$ + Blut	ns	ns	ns	

**Tabelle 4.1 Korrelation TH17-Zellen und IFN $\gamma$  Expression in CD4+ und CD8+ T-Zellen**  
Dargestellt sind die einzelnen Korrelationen zwischen TH17- und Effektor T-Zellen (ns = nicht signifikant)



Im peripheren Blut korrelierten die TH17-Zellen signifikant mit den CD4+ Effektor-T-Zellen (Abbildung 4.8a-c). Abgesehen von den CD8+ Effektor-T-Zellen im peripheren Blut und im CD163<sup>high</sup> Subset im Aszites kann somit eine funktionelle Abhängigkeit zwischen CD4+ und CD8+ Effektor T-Zellen und TH17-Zellen beschrieben werden. Diese ist vor allem im Aszitesmilieu – und damit in direkter Umgebung des Tumors – festzustellen.



Als zweiten Marker der Effektor-T-Zell Antwort wurde die Proliferation von CD4+ und CD8+ T-Zellen untersucht und mit der Frequenz an TH17-Zellen verglichen, wobei sich herausstellte, dass weder im Aszites, noch im peripheren Blut statistisch signifikante Zusammenhänge bestehen. Dies galt für das Gesamtkollektiv wie auch im Rahmen einer Subgruppenanalyse von CD163<sup>low</sup> und CD163<sup>high</sup> Patientinnen (Daten hier nicht dargestellt).

#### 4.6 ASSOZIATIONEN ZWISCHEN TAM-POLARISIERUNGSMARKERN UND EFFEKTOR-T-ZELLEN

Da Patientinnen mit CD163<sup>high</sup> TAM-Phänotyp eine stärkere Effektor-T-Zell Antwort aufwiesen - wie sowohl anhand der proliferativen Kapazität als auch anhand der IFNγ-expression gezeigt wurde - ist es interessant zu analysieren, inwiefern die Expression anderer TAM-assoziiierter Marker die Effektor-T-Zellpopulation beeinflusst. Daher wurden auch andere TAM-Polarisierungsmarker (klassische M2-marker: CD163,

## Ergebnisteil

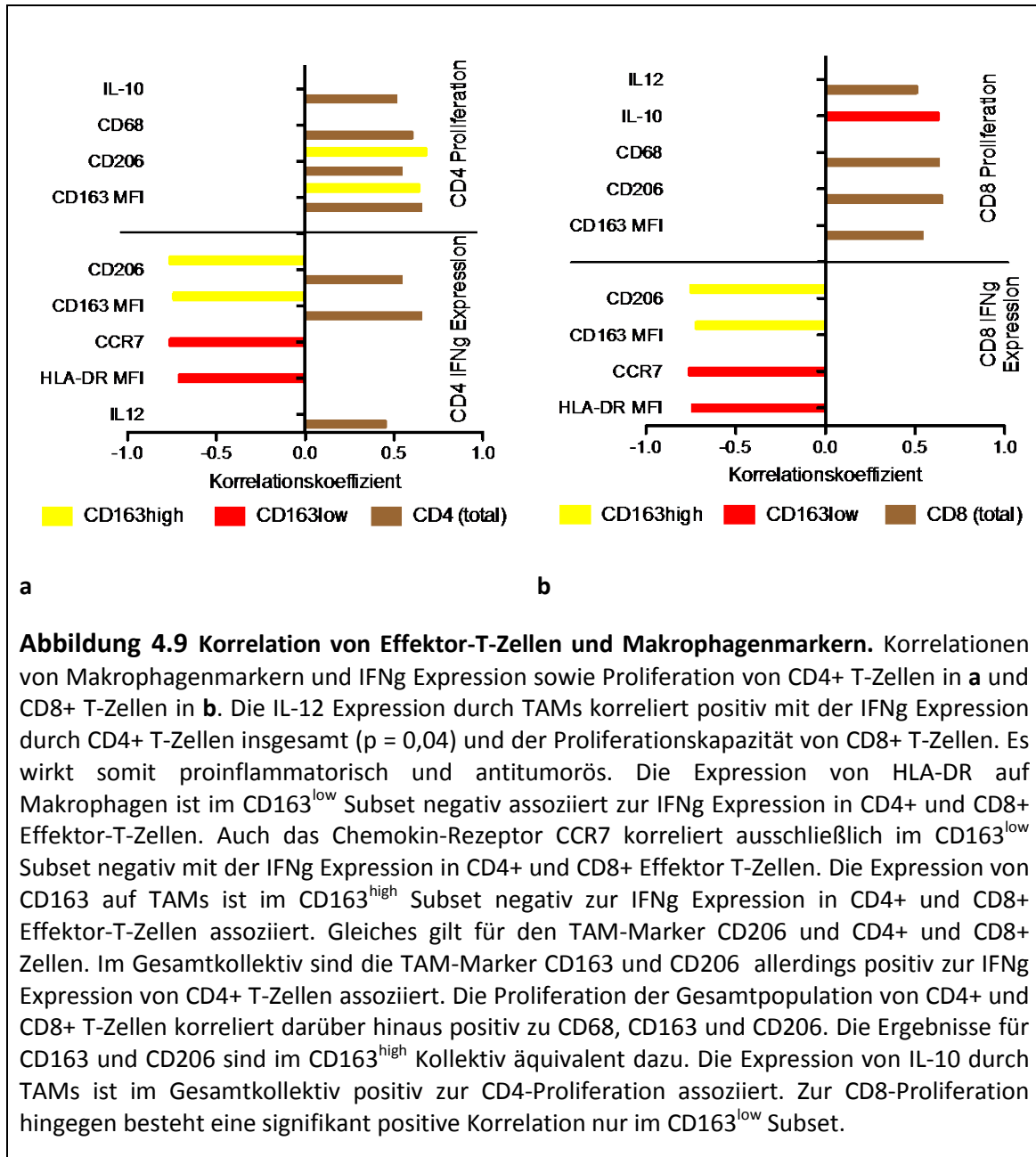
CD206, IL10, IL-12, M1-Marker: CCR7; Fc-rezeptoren CD32, CD64 und allgemeine Makrophagen-Oberflächenmoleküle: CD14, CD16, CD68 und HLA-DR) diesbezüglich untersucht. Dazu wurden die verschiedenen Makrophagenmarker zum einen mit der Frequenz CD4+IFN $\gamma$ + bzw. CD8+IFN $\gamma$ + T-Zellen nach mitogenem Stimulus und zum anderen mit der Fähigkeit zur T-Zellproliferation nach CD3 Stimulus korreliert und es wurde eine Subgruppenanalyse gemäß der CD163<sup>low</sup> und CD163<sup>high</sup> Einteilung durchgeführt. Da im peripheren Blut keine signifikanten Korrelationen auftraten, die sich mit denen im Aszites hätten vergleichen lassen, werden diese Daten im Folgenden nicht extra erläutert.

In der Gesamtpopulation CD4+ T-Zellen gab es zur IFN $\gamma$ -Expression signifikant positive Korrelationen zu CD163, CD206 und IL-12. Interessanterweise war die Expression von CD163 und CD206 auf Makrophagen im Gegensatz dazu im CD163<sup>high</sup> Kollektiv sowohl zu CD4+ als auch zu CD8+ T-Zellen negativ assoziiert. In der CD163<sup>low</sup> Gruppe korrelierte die MFI von HLA-DR stark negativ zur IFN $\gamma$  Expression sowohl durch CD4+ ( $r=-0,71$ ) als auch durch CD8+ T-Zellen ( $r=-0,74$ ). Äquivalent verhielt sich der M1-Marker CCR7 zu den CD4+ ( $r=-0,76$ ) und CD8+ T-Zellen ( $r=-0,76$ ).

Die proliferative Kapazität der Effektor-T-Zellen war durchweg positiv mit den Makrophagenmarkern assoziiert. Das Ausmaß der Proliferation von CD4+ und CD8+ T-Zellen korrelierte in der Gesamtpopulation mit der CD68, CD163 und CD206 Expression. Zusätzlich bestand insgesamt zwischen der Proliferation CD4+ T-Zellen und der IL-10 Expression durch Makrophagen eine positive Korrelation. Die totale CD8+ T-Zell Proliferation korrelierte positiv mit der IL-12 Expression. Im CD163<sup>high</sup> Subset bestätigten sich die Beobachtungen zwischen der CD4+ Proliferation und CD163 ( $r=0,64$ ) sowie CD206 ( $r=0,68$ ). Im CD163<sup>low</sup> Subset bestanden eine positive Assoziationen zwischen der CD8+ T-Zell Proliferation und der IL-10 Expression von Makrophagen.

Während die Expression von IFN $\gamma$  durch T-Zellen und damit die antitumoröse Immunantwort sich also insgesamt eher negativ zu verschiedenen Makrophagenmarkern verhält, fördern TAMs wiederum die proliferative Kapazität von T-Zellen. Besonders deutlich stellt sich das im CD163<sup>high</sup> Subset mit den Markern CD163 und CD206 dar, die mit der IFN $\gamma$ -Expression der Effektor-T-Zellen negativ und der

proliferativen Kapazität von CD4+ T-Zellen positiv korrelierten. Betrachtet man die Gesamtpopulation, so besteht allerdings auch eine positive Assoziation zwischen der CD4+ IFN $\gamma$  T-Zellpopulation und CD163 und CD206 (Abbildung 4.9).

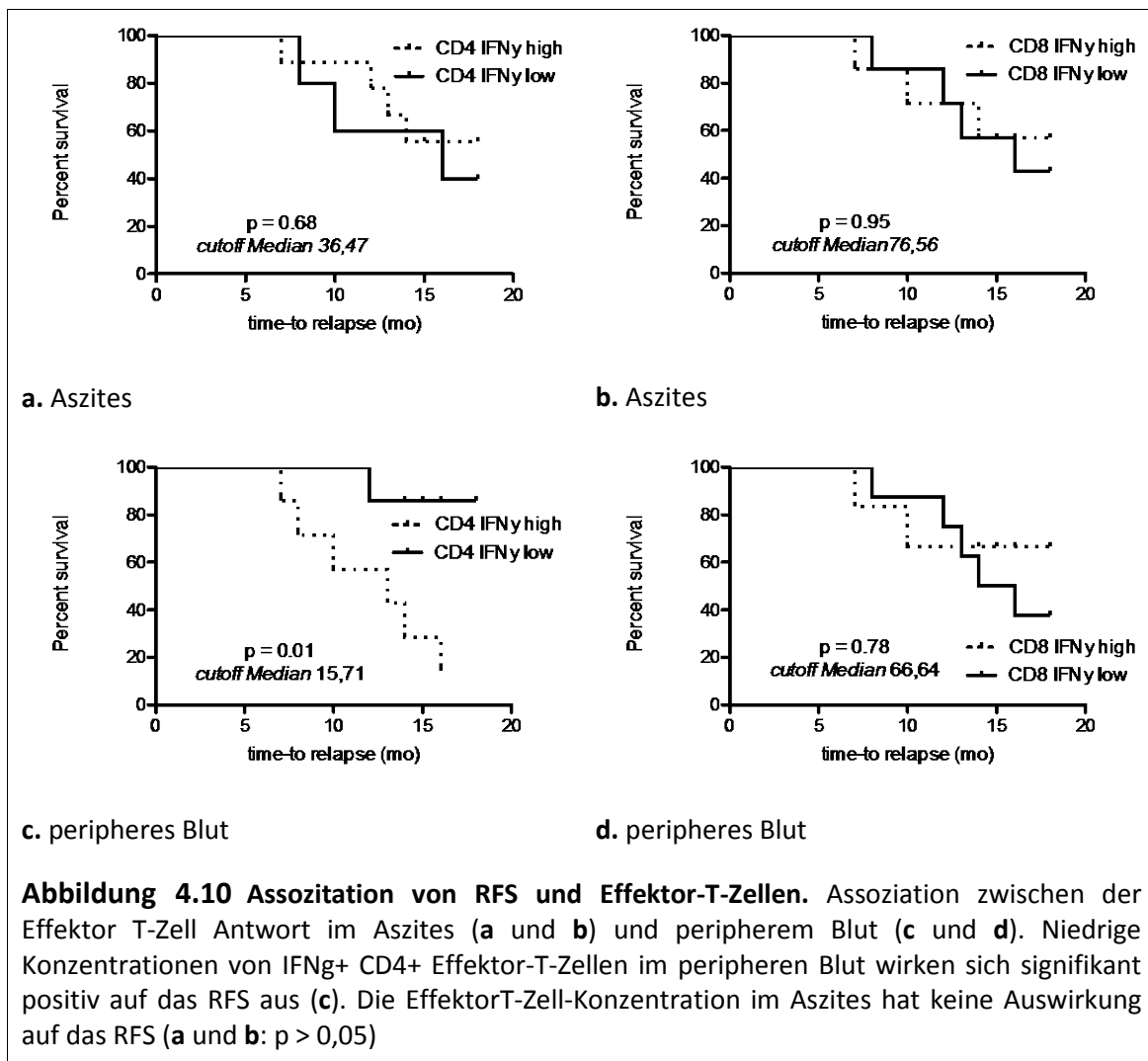


#### 4.7 AUSWIRKUNG VON EFFEKTOR T-ZELLEN AUF DAS RFS (RELAPSE FREE SURVIVAL)

Analog zu der klinischen Response der TH17-Population wurde untersucht, inwiefern die IFN $\gamma$ -Expression in Effektor-T-Zellen und deren Proliferationskapazität das Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen beeinflussen könnte. Die Einteilung der Proben erfolgte ebenfalls nach dem jeweiligen Median der Proben als *cutoff*.

## Ergebnisteil

Eine signifikant inverse Korrelation wurde nur für CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen in peripherem Blut beobachtet ( $p = 0,01$ ). Patientinnen vom IFN $\gamma$ <sup>low</sup> Typ hatten dort ein signifikant längeres RFS (Abbildung 4.10c). Für CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestätigte sich diese Beobachtung nicht. Für die Frequenz von IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen im Aszites konnte keine Assoziation zum RFS detektiert werden. Eine Differenzierung der Proben in hohe bzw. niedrige proliferative Kapazität zeigte weder im Aszites noch im peripheren Blut Unterschiede im RFS.



## 4.8 TREG EFFEKTE AUF TH17- UND EFFEKTOR-T-ZELLEN

Genau wie TH17-Zellen sind Tregs heterogen im Zusammenspiel mit Tumoren. Bekannt sind sie vor allem für ihre suppressive Aktivität unter anderem auf Effektor-T-Zellen. Um mögliche Kostimulationen oder Suppressionen bei ihrer Aktivität im

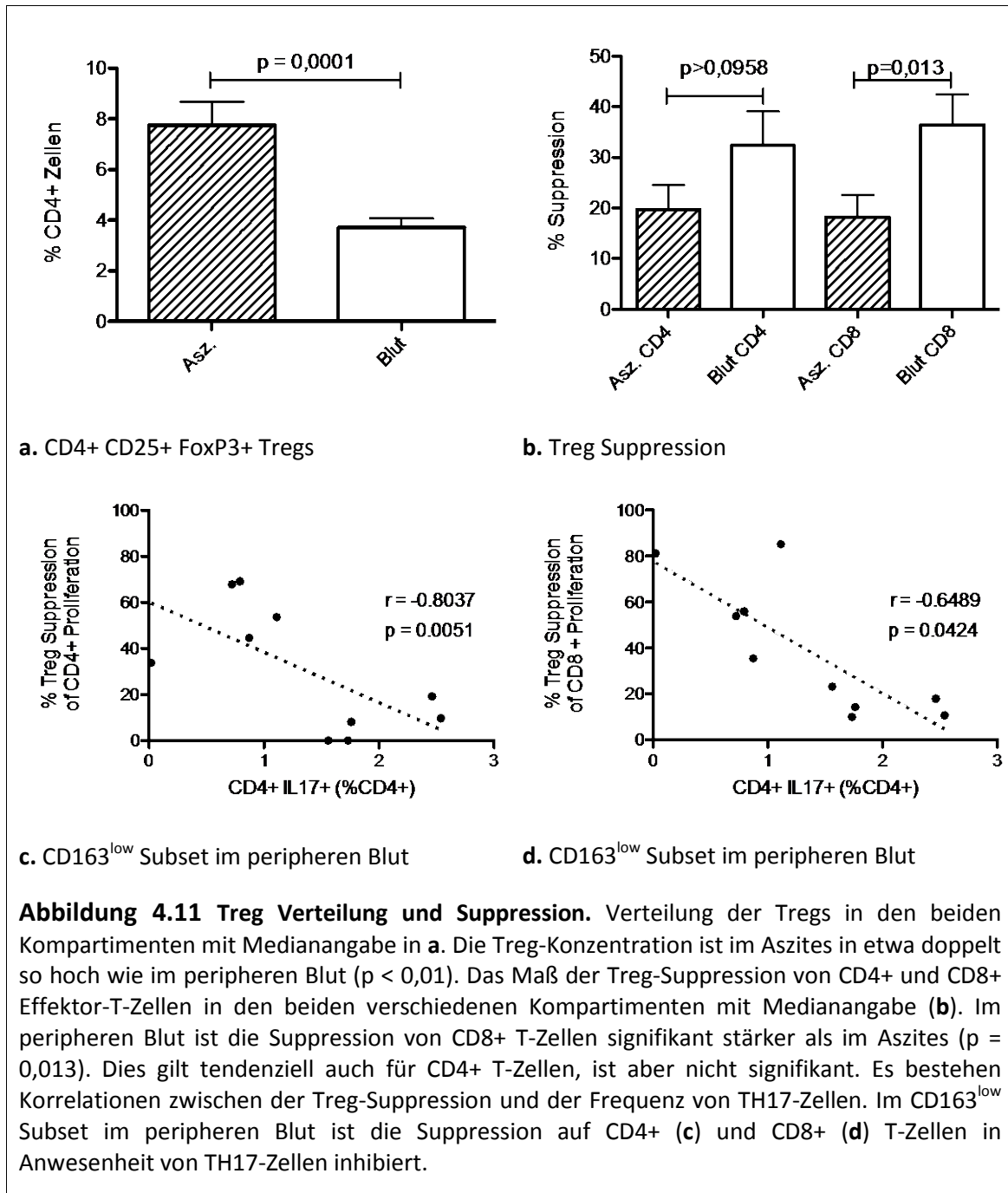
## Ergebnisteil

inflammatorischen Tumormilieu aufzuzeigen, wurden die T-Zell Subsets auf Korrelationen zueinander untersucht,.

Im Gegensatz zu den TH17-Zellen waren die Tregs in den beiden Kompartimenten unterschiedlich verteilt und konnten signifikant vermehrt im Aszites nachgewiesen werden (Abbildung 4.10a). Zwischen TH17-Zellen und Tregs bestanden für das Gesamtkollektiv und im Aszites keine korrelativen Zusammenhänge.

Im Treg-Suppressionsassay konnte gezeigt werden, dass Tregs die Proliferationskapazität von Effektor T-Zellen unterschiedlich stark inhibieren. Im peripheren Blut wurden CD8+ Effektor-T-Zellen signifikant stärker supprimiert als im Aszites. Es bestand auch eine Tendenz zu stärkerer Suppression von CD4+ Effektor-T-Zellen, die aber nicht signifikant war.

Die Frequenz von TH17 korrelierte beim CD163<sup>low</sup> Zellsupset im peripheren Blut negativ mit der Suppressoraktivität von Tregs (Abbildung 4.10c und d).



#### 4.9 TH17-ZELLEN IM ZUSAMMENHANG MIT MDSCs

MDSCs reichern sich während der Tumorentwicklung allgemein vermehrt im peripheren Blut und im Tumorgewebe an. Sie bilden eine heterogene Gruppe aus myeloiden Zellen, die ähnlich wie TH17-Zellen plastisch sind und sich in verschiedenen Entwicklungsstufen befinden. Sie scheinen eher protumorigen zu wirken und sind in

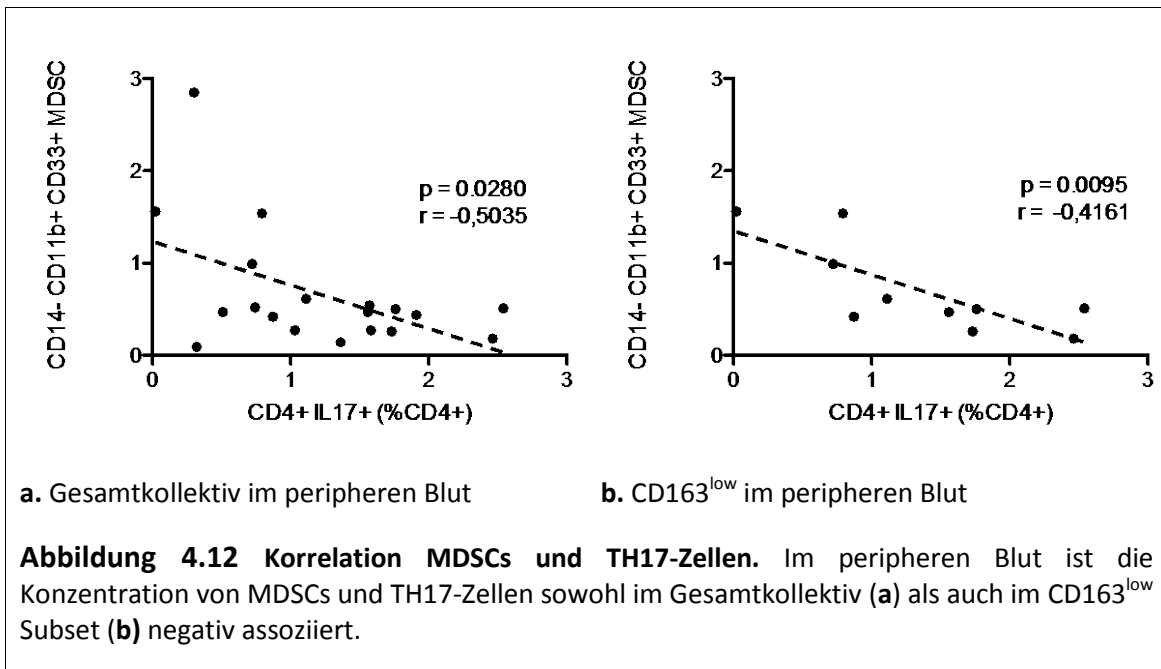


## Ergebnisteil

der Lage T-Zellantworten zu supprimieren und eine Anreicherung von Tregs zu begünstigen. Um ihre Funktion speziell beim Ovarialkarzinom im Zusammenhang mit TH17-Zellen zu untersuchen, wurde die Verteilung dieser beiden Zelltypen bestimmt und miteinander verglichen.

Im Gesamtkollektiv und im  $CD163^{low}$  Kollektiv waren im peripheren Blut negative Assoziationen zwischen  $CD14-CD11b+CD33+$  MDSCs und der TH-17 Frequenz zu beobachten. Dagegen waren die Ergebnisse im  $CD163^{high}$  Patientenkollektiv nicht signifikant, genauso wenig wie im Aszites generell.

Wie bei der Suppressionsaktivität der Tregs korrelierte somit interessanterweise nur das  $CD163^{low}$  Subset im peripheren Blut (Abbildung 4.12).



## 5 DISKUSSION

Das Ovarialkarzinom entwickelt sich meist über einen langen Zeitraum symptomfrei, sodass zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oft bereits ein fortgeschrittenes Stadium erreicht ist, das sich häufig durch Peritonealmetastasen und konkomittierendem Aszites äußert. Damit ist die Prognose in der Regel schlecht. Der maligne Aszites enthält als Ausdruck der tumorbegleitenden Inflammation viele Immunzellen, wobei die genaue Rolle der einzelnen Immunzellsubsets bei der Entwicklung und Progression maligner Tumore trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren noch nicht endgültig geklärt ist. Veröffentlichungen der letzten Jahre liefern speziell für das Ovarialkarzinom kontroverse Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit wurden TAMs, TH17-Zellen, Tregs und Effektort T-Zellen im Aszites und im peripheren Blut von einem Kollektiv aus 20 Patientinnen mit fortgeschrittenem, serösem Ovarialkarzinom erstmalig systematisch untersucht. In die Auswertung konnten die Ergebnisse einer Parallelstudie (Reinartz et al. 2013) inkludiert werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Korrelationsanalysen und der klinischen Nachbeobachtung der Patientinnen auf Grundlage des aktuellen Stands der Forschung diskutiert.

### 5.1 DER PROGNOSTISCHE WERT VON TH17-ZELLEN

Das Tumormilieu beinhaltet immer auch eine inflammatorische Komponente, die beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom durch den engen Bezug zur Peritonealhöhle in Form von Aszites auftritt. TH17-Zellen erfüllen als Teil der Immunantwort sowohl pro- als auch antitumoröse Funktionen. Speziell beim Ovarialkarzinom wird ihre Rolle hinsichtlich der Auswirkung auf die Prognose kontrovers diskutiert.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass bei Ovarialkarzinompatientinnen kein signifikanter Unterschied im Vorkommen von TH17-Zellen zwischen Aszites und der Peripherie besteht. Proben mit vielen und solche mit wenig TH17-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede im progressionsfreien Überleben. Auch wenn das Signifikanzniveau überschritten wird ( $p: 0,16 > 0,05$ ), haben Proben mit einer hohen TH17-Zell Zahl tendenziell ein verlängertes, rezidivfreies Überleben.

## Diskussion

Während in einigen Studien am Ovarialkarzinom TH17-Zellen bzw. IL-17 einen positiven Effekt auf die Prognose hatten (Droeser et al. 2013, Kryczek et al. 2009a), induzierten in anderen Studien hohe Konzentrationen an IL-17 das Tumorwachstum (Charles et al. 2009) bzw. die Angiogenese (Kato et al. 2001). Miyahara et al. (2008) konnten zwar in 5 von 10 Proben aus Ovarialkarzinom-Gewebe erhöhte Level an TH17-Zellen innerhalb der T-Zell Population im Vergleich zu Blutproben gesunder Probanden feststellen, die 5 anderen Proben enthielten allerdings vergleichbare Konzentrationen. Lan et al. (2013) wiesen nach, dass im Vergleich zu normalem Ovarialgewebe die Level an IL-17 im Tumor signifikant erhöht waren. Das progressionsfreie Überleben war in der Studie bei hohen IL-17 Konzentrationen verlängert, nicht aber das Überleben insgesamt. Kryczek et al. (2009a) fanden vermehrt TH17-Zellen im soliden Ovarialkarzinom verglichen mit dem peripherem Blut der Patientinnen. In fortgeschrittenen Stadien fand sich zudem weniger IL-17. Zusätzlich war die IL-17 Konzentration im Aszites positiv mit der Prognose assoziiert. Allerdings wurden im Gegensatz zur durchgeführten Studie die Proben für die Survivalanalyse nach dem IL-17-Level in pg/ml und nicht dem prozentualen Anteil der TH17-Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> Zellen eingeteilt. Da nur an einem singulären Zeitpunkt eine Parazentese durchgeführt wurde, kann über den klinischen Verlauf der Zellkonzentrationen im untersuchten Patientenkollektiv keine Aussage getroffen werden. Fraglich ist, ob IL-17 auch von anderen Immunzellen als T-Zellen gebildet wird, wie für andere Tumorentitäten beschrieben (Cua et al. 2010, Wang et al. 2013, Zhu et al. 2008, Lin et al. 2007). Ob das auch für das Ovarialkarzinom gilt, ist unklar. Laut der Studie von Kryczek et al. (2009a) wird IL-17 exklusiv von T-Zellen gebildet und ist mit der Frequenz von TH17-Zellen gleichzusetzen. Allgemein wird aktuell allerdings zwischen IL-17 und TH17 distiguiert (Punt et al. 2015). TH17-Zellen sind in der Lage, temporär zwischen unterschiedlichen Differenzierungszuständen zu switchen, wobei jedoch die genauen Einflussfaktoren und Auswirkungen auf ihre immunmodulierende Funktion dabei noch weitestgehend unerforscht sind.

Die erzielten Ergebnisse müssen vor dem Hintergrund diskutiert werden, dass in die Survivalanalysen nur ein kleines Kollektiv aus 14 Proben inkludiert werden konnte. Der Signifikanzwert für ein verbessertes RFS bei Aszitesproben mit einer hohen Frequenz

## Diskussion

an TH17-Zellen ( $p=0,16$ ) überschreitet zwar das Signifikanzniveau, bestätigt grundsätzlich aber die Ergebnisse von Kryczek et al. für hohe IL-17 Konzentrationen im Aszites.

Auf Grundlage der differenten Ergebnisse muss man feststellen, dass sich die Erkenntnisse aus Studien mit soliden Tumoren nicht ohne weiteres auf Aszitesproben übertragen lassen, obwohl tendenzielle Übereinstimmungen bestanden, die es anhand von größeren Patientenkollektiven zu bestätigen gilt. Um den Zusammenhang von TH17-Zellen und der Prognose weiter zu erforschen, sollten sich zukünftige Studien detailliert mit der TH17-Dynamik im Verlauf der Tumorprogression beschäftigen.

### **5.2 KORRELATION ZWISCHEN TAM-PHÄNOTYP UND DER TH17 POLARISATION**

Im Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen bilden TAMs den Großteil der Antigen präsentierenden Zellen. Ihr Phänotyp und ihre Funktionalität unterliegen multiplen Faktoren des Tumormilieus (Wilke et al. 2011). Makrophagen exprimieren u.a. die charakteristischen Oberflächenmoleküle CD14, ein Lipopolysaccharid Ko-Rezeptor für den TLR-4 Komplex und den Fc  $\gamma$  -Rezeptor-III CD16, der an der Phagozytose beteiligt ist. Zusammen mit CD14 und CD16 werden je nach Polarisierungszustand weitere Makrophagenmarker koexprimiert: HLA-DR ist ein MHC-II Oberflächenrezeptor und somit beteiligt an der Antigenpräsentation. Weitere Marker werden zwei unterschiedlichen Phänotypen zugeordnet: Klassisch aktivierte Makrophagen (M1) gelten dabei als tumorsuppressiv im Gegensatz zu alternativ aktivierten Makrophagen (M2). M1 Zellen exprimieren typischerweise die Fc-Rezeptoren CD32 und CD64 sowie das am Homing beteiligte Chemokin CCR7. Typische M2-Marker sind der Scavenger-Rezeptor CD163, der Mannose Rezeptor 206 und das immunsuppressive IL-10. Diese dichotome Betrachtung von zwei extremen funktionellen Phänotypen wird mittlerweile verlassen. Angesichts der Identifikation zahlreicher neuer immunrelevanter Einflussfaktoren auf die Makrophagen-Differenzierung sowie deren Fähigkeit plastisch auf Umwelteinflüsse zu reagieren, wird mittlerweile von unzähligen gemischten Phänotypen ausgegangen, die am ehesten einem M1/M2 Phänotyp entsprechen.

## Diskussion

Aus einer Parallelstudie an denselben Proben konnten die Daten zum Phänotyp der TAMs, zu Zytokinen im Aszites und der klinischen Nachbeobachtung in diese Arbeit inkludiert werden (vgl. Reinartz et al. 2013). Die Parallelstudie weist eine inverse Korrelation zwischen der Expression des Makrophagenmarkers CD163 und dem progressionsfreiem Überleben nach. Die Expression von CD163 ist dabei IL-6 und IL-10 abhängig. Diese beiden Zytokine sind auch an der Regulation von TH17-Zellen beteiligt. Von den Antigen präsentierenden Zellen induzieren Makrophagen am effektivsten TH17-Zellen (Kryczek et al. 2009a). Da die Regulationsmechanismen der Funktion von TH-17 Zellen noch nicht gänzlich erforscht sind, wurde in Korrelationsanalysen geprüft, ob CD163 und andere bisher nicht betrachtete Makrophagenmarkern einen Einfluss auf die TH17-Zell Frequenz haben.

Die Zahl der TH17-Zellen korreliert im Gesamtkollektiv positiv mit der CD163 Expression. In Anwesenheit von überwiegend CD163<sup>low</sup> TAMs kommen dementsprechend im Aszites signifikant weniger TH17-Zellen vor als im peripheren Blut. Insgesamt ist die TH17-Zellantwort auch leicht positiv zur Konzentration von IL-10 assoziiert. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Wirkung weiterer Makrophagenmarker auf die TH17-Differenzierung von der CD163-Polarisierung abhängig ist. Bei Patientinnen mit prädominanten CD163<sup>low</sup> TAMs korreliert die TH17 Frequenz im Aszites positiv mit den Markern CD14 und den beiden low-affinity-Rezeptoren CD16 und CD32. Demgegenüber bestehen negative Korrelationen zu den high-affinity FcR CD64, HLA-DR und CCR7. In Proben mit vorwiegend CD163<sup>high</sup> TAMs besteht neben der CD163-Assoziation ebenfalls eine positive Korrelationen zu HLA-DR.

Tatano et al. (2014) haben nach mykobakterieller Infektion eine CD163<sup>high</sup> IL-10<sup>high</sup> Makrophagen Population beschrieben, die einen stimulierenden Effekt auf die TH17-Zellen hat. Im Gegensatz zu anderen T-Zellen exprimieren TH17-Zellen hohe Level an IL-10 Rezeptoren (Huber et al. 2011), können aber auch IL-10 aktivierungsabhängig selber produzieren (Zielinski et al. 2012). Durch eine reziproke Rückkopplung sinkt nach einer Aktivierung bei steigender IL-10 Produktion das Level an IL-17 wieder. In Co-Kulturen von TAMs und CD4+ T-Zellen kann die Suppression der T-Zellantwort durch die Gabe von IL-10 Antikörpern geblockt werden (Goyne et al 2014). Die durchgeführte Studie zeigt, dass beim Ovarialkarzinom die immunsuppressiven

## Diskussion

Makrophagenmarker CD163 und IL-10 positiv mit den TH17-Zellen assoziiert sind. Inwiefern die Funktionalität der TH-17 Zellen davon abhängt und die Induktion oder Rekrutierung von TH17-Zellen durch TAMs abhängig vom Polarisierungszustand beeinflusst wird, sollte deswegen in speziellen, funktionalen Assays näher untersucht werden.

Außerdem wird die TH17-Differenzierung im Aszites auch durch TAMs mit zusätzlich hoher HLA-DR-Expression begünstigt (CD163<sup>high</sup>HLA-DR<sup>high</sup>). Eine Subpopulation der CD163<sup>low</sup> TAMs mit dem Phänotyp CD16<sup>high</sup>CD32<sup>high</sup>CD64<sup>low</sup>HLA-DR<sup>low</sup>CCR7<sup>low</sup> wirkt sich ebenfalls positiv auf die Differenzierung aus.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass TAMs die TH17-Antwort substantiell mitregulieren könnten. Der Phänotyp der Makrophagen entspricht dabei nicht der einfachen Einteilung in M1 und M2, sondern muss näher differenziert werden. Sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine sind in der Lage, TH17-Zellen zu induzieren. Um weitere Erkenntnisse auf diesem Gebiet zu erlangen, wäre es sinnvoll, die identifizierten TAM-Subsets zusammen mit TH17-Zellen zu kultivieren, um das Verhalten von TH17-Zellen nach Induktion zu untersuchen.

### 5.3 TH17- UND IMMUNSUPPRESSIVE IMMUNZELLEN IM KONTEXT DER TUMORGENESE

Eine Voraussetzung für die Entwicklung des Ovarialkarzinoms ist, dass die Immunantwort gegen Tumorzellen nicht adäquat erfolgt. Mitverantwortlich für die Immunsuppression sind Tregs und MDSCs (Wang HY et al. 2007; He et al. 2010). Inwiefern dabei immunsuppressiven Zellen mit TH17-Zellen interagieren, ist weitestgehend unerforscht.

Für die Anzahl an Tregs fand sich im Verteilungsmuster eine Diskrepanz hin zu signifikant mehr Tregs im Aszites verglichen zur Peripherie. Das spricht dafür, dass Tregs aktiv ins Tumormilieu rekrutiert werden, wie bereits andere Studien beim Ovarialkarzinom gezeigt haben (Curiel et al. 2004; Kryczek et al. 2007a). In der Subgruppenanalyse zeigten sich in der Anzahl der Tregs keine weiteren Unterschiede zwischen Proben mit vorwiegend CD163<sup>low</sup> oder CD163<sup>high</sup> Makrophagen. Die Zahl der TH17-Zellen korreliert allgemein weder quantitativ mit der Frequenz der Tregs noch

## Diskussion

funktionell mit ihrer suppressiven Aktivität auf Effektor-T-Zellen. Lediglich in den CD163<sup>low</sup> Proben im peripheren Blut konnte eine negative Korrelation zwischen den TH17-Zellen und der Suppressionskapazität der Tregs festgestellt werden. Sollte sich diese Beobachtung bestätigen, wäre es interessant zu erforschen, wieso die Suppression im Aszites nicht durch TH17-Zellen gehemmt wird.

Zhang Y et al. (2011) konnten beim Cervix-Karzinom nur bei gesunden Probandinnen Korrelationen zwischen TH17 und Tregs beobachten und mutmaßten, dass im Zuge der Immunmodulation im Tumormilieu diese Balance gebrochen wird. Das würde erklären, warum im Aszites zwar vermehrt Tregs nicht aber TH17-Zellen gefunden werden. Beim Ovarialkarzinom ist es aber auch möglich, dass sich bei erhöhter Anzahl an TH17-Zellen synchron auch die Treg-Frequenz erhöht und somit eine enge Beziehung zwischen den beiden T-Zell Subsets besteht (Kryczek et al. 2007a). Auch eine reziproke Regulation der beiden Subsets durch Zytokine im Tumormilieu wurde beschrieben (Myahara et al. 2008). Im Verlaufe der Tumorerkrankung könnte sich eine Dominanz zwischen den beiden Subsets abwechseln, was eine Erklärung für die fehlende Assoziation in dieser Arbeit wäre. Laut Fialova et al. (2013) bewirken bislang unbekannte Faktoren beim Ovarialkarzinom einen Switch der T-Zell Population von einer TH17-Dominanz in frühen Tumorstadien zu einer Treg-Dominanz im Verlauf der Erkrankung. Da die hier verwendeten Proben fast ausschließlich von Patientinnen im Stadium pT3 stammten, wäre es insofern sinnvoll, eine vergleichende Analyse mit anderen Stadien vorzunehmen, um zu überprüfen, ob sich in der Progression des Ovarialkarzinoms das Verhältnis zwischen den T-Zell Subsets verändert.

Die Unterschiede zwischen den Studien machen deutlich, dass eine einfache Charakterisierung von Tregs durch FoxP3 und TH17-Zellen durch IL-17 beim Ovarialkarzinom nicht den komplexen Interaktionen im Tumormilieu gerecht wird. Infiltrierende Tregs können sich in Anwesenheit von IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-23 zu TH17-Zellen differenzieren (El-Behi et al. 2011) und sowohl IL-17 als auch FoxP3 werden zusätzlich auch von anderen Zellen gebildet. FoxP3 wird zum Beispiel auch von Ovarialkarzinom-Zellen exprimiert (Zhang et al. 2010), aber nicht jede FoxP3 exprimierende Zelle übt konsekutiv suppressive Aktivitäten aus (Wing et al. 2010). Andersherum gibt es auch Immunzellen, die sich FoxP3 unabhängig wie Tregs

verhalten (Shevach 2006). Die erzielten Ergebnisse bestätigen den Ansatz, dass eine differenzierte Betrachtungsweise erforderlich ist, um den wechselseitigen Einfluss der T-Zellen angemessen abzubilden.

Ein weiteres immunsuppressives Zellsupset sind die MDSCs. In dieser Studie wird gezeigt, dass TH17-Zellen im Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen nicht maßgeblich von MDSCs supprimiert werden.

An Mäusen wurde nachgewiesen, dass beim Lymphom und Melanom unter genetischer Ablation von IL-17 das Tumorwachstum durch reduzierte MDSC-Akkumulation bei gleichzeitig erhöhter CD8<sup>+</sup> T-Zell Infiltration beeinträchtigt ist (He et al. 2010). Demzufolge unterstützen TH17-Zellen MDSCs bei der Suppression von Effektor-T-Zellen. MDSCs konstituieren allerdings eine heterogene Zellpopulation, die mindestens aus zwei Subpopulation besteht. Unterschieden werden demnach mononuclear cells (MO-MDSCs), die inflammatorischen Monozyten ähneln, von low-density polymorphonuclear cells (PMN-MDSCs), die mit unreifen Neutrophilen vergleichbar sind (Movahedi et al. 2008). Ob TH17-Zellen subsetabhängig mit den MDSCs interagieren, bleibt offen, da in den Versuchen nicht zwischen diesen Subsets differenziert wurde. Eine andere Studie konnte speziell beim Ovarialkarzinom nachweisen, dass IL-17 TNF- $\alpha$  abhängig produziert wird und zu MDSC-Rekrutierung in das Tumormilieu und zu Tumorwachstum führt (Charles et al 2009). Nach den erzielten Erkenntnissen führen TH17-Zellen allein nicht zu einer Rekrutierung von MDSCs, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass sie dazu aktiviert werden können. Interessant wäre es zu prüfen, ob es neben TNF- $\alpha$  noch andere Aktivatoren gibt und von welchen Zellen sie gebildet werden. Es sind differenzierte Analysen zum Phänotyp der untersuchten Immunzellen notwendig, um weitere beteiligte Moleküle wie TNF- $\alpha$  zu identifizieren und die Regulationsmechanismen noch besser zu verstehen.

### **5.4 EFFEKTOR-T-ZELLEN UND IHRE ROLLE ALS PROGNOSEFAKTOR**

Die zytotoxische Aktivität von Effektor-T-Zellen ist ein wichtiger Mechanismus der antitumorösen Immunantwort. Insbesondere CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen sind potent darin, Tumorzellen zu erkennen, zu eliminieren und somit eine antitumoröse



## Diskussion

Immunantwort einzuleiten (Martin-Orozco et al. 2009; Dranoff et al. 2013). Die Mechanismen, welche die Effektor-T-Zell Antwort beim Ovarialkarzinom inhibieren, sind komplex und werden bislang nicht völlig verstanden. Um die T-Zell-Antwort in den Proben zu beurteilen, wurde IFN $\gamma$  bestimmt, das als stark inflammatorisches Zytokin die Qualität der Immunreaktion sowohl von CD4 $^{+}$  als auch CD8 $^{+}$  T-Zellen beschreibt. Durch die Quantifizierung der Proliferationskapazität konnte ergänzend die Reaktion der T-Zellen auf einen CD3 Stimulus beurteilt werden. Aus den beiden Assays ergaben sich Hinweise zur Verteilung der T-Zellen und ihrer Auswirkung auf den klinischen Verlauf beim Ovarialkarzinom.

In dieser Studie wird gezeigt, dass weder die Frequenz der CD8 $^{+}$  T-Zellen noch ihre IFN $\gamma$  Expression im Aszites erhöht ist, auch wenn im Vergleich zu den CD4 $^{+}$  T-Zellen mehr IFN $\gamma$  durch CD8 $^{+}$  T-Zellen gebildet wird. In Stimulationsassays wurde einzig für die CD163<sup>high</sup> Subgruppe eine erhöhte Proliferationsfähigkeit dokumentiert, die allerdings nicht zu einem erhöhten Anteil von CD8 $^{+}$  Zellen an der Leukozytenpopulation führt. CD8 $^{+}$  Effektor-T-Zellen werden demnach im malignen Aszites nicht verstärkt aktiviert. CD4 $^{+}$  Effektor-T-Zellen sind insgesamt zahlreicher als CD8 $^{+}$  T-Zellen. In der CD4 $^{+}$  T-Zell Population sind mit der IFN $\gamma$  Expression und der Proliferation nach polyklonalem CD3-Stimulus beide untersuchten Merkmale potenter im Aszites als im peripheren Blut. Der Anteil CD4 $^{+}$  T-Zellen an der Leukozytenpopulation ist im Aszites aber trotzdem reduziert. Somit fällt auf, dass zwar wenige CD4 $^{+}$  Effektor-T-Zellen im Aszites vorkommen, dort aber dafür deutlich stärker IFN $\gamma$  bilden.

Die Verteilung der T-Zellen mit einer Dominanz CD4 $^{+}$  T-Zellen in der Gesamtpopulation entspricht der aktuellen Datenlage beim Ovarialkarzinom. Es bleibt allerdings offen, ob beide Populationen im Blut gegenüber dem Aszites erhöht (Santin et al. 2001), identisch verteilt (Bamias et al. 2007) oder nur die CD4 $^{+}$  T-Zellen im peripheren Blut frequenter sind, wie in dieser Studie gezeigt. Deutlich wird allerdings, dass die Immunantwort im Aszites nur bei den CD4 $^{+}$  T-Zellen gesteigert ist. Den zytotoxischen CD8 $^{+}$  T-Zellen fehlen offensichtlich aktivierende Stimuli. Eine verstärkte CD8 $^{+}$  T-Zell Antwort kann vor allem in soliden Tumoren nachgewiesen werden. Das Fehlen von

## Diskussion

Tumorantigenen sowie geringe Hypoxie und TNF $\alpha$  Level im Aszites werden als mögliche Ursachen für die fehlende Induktion diskutiert (Bamias et al. 2007).

Proben mit verstärkter IFN $\gamma$  Expression oder erhöhter Proliferationskapazität durch CD4 $^{+}$  T-Zellen im Aszites haben keinen Vorteil im progressionsfreien Überleben. Auch die Ergebnisse der CD8 $^{+}$  Effektor-T-Zellen zeigen keine Unterschiede. Somit eignen sich IFN $\gamma$  Expression und Proliferationskapazität als Qualitäten der T-Zell Immunantwort im Aszites nicht für eine Einschätzung der Prognose beim Ovarialkarzinom.

Zhang L et al. konnten bereits 2003 nachweisen, dass die 5-Jahres-Überlebensrate von Patientinnen, deren Ovarialkarzinom-Gewebe von CD3 $^{+}$  T-Lymphozyten infiltriert war, mit 38% signifikant höher war als die 5-Jahres-Überlebensrate von 4,5% der Patientinnen mit T-Lymphozyten freiem Tumorgewebe. Die T-Zell Antwort war dabei u.a. zur IFN $\gamma$ -Expression assoziiert. Die Ergebnisse für allein CD3 $^{+}$  T-Zellen bestätigten sich zwar nicht in Untersuchungen von Sato et al. (2005), dafür ergab sich aber ein Überlebensvorteil für einen hohen Anteil an CD3 $^{+}$  CD8 $^{+}$  T-Zellen gegenüber CD3 $^{+}$  CD4 $^{+}$  T-Zellen. Infiltrierende CD8 $^{+}$  T-Zellen korrelieren sogar bei allen histologischen Ovarialkarzinom Typen stadienunabhängig mit einem verbesserten klinischen Outcome (Hamanishi et al. 2007; Clarke et al. 2009). Für Aszitesproben konnte ein Überlebensvorteil von Proben mit vielen CD8 $^{+}$  T-Zellen bislang nicht belegt werden. Da im Aszites nicht signifikant mehr Effektor-T-Zellen vorkamen als im peripheren Blut, ist es möglich, dass sich durch eine Verstärkung der Immunantwort mit erhöhter Zellzahl auch die Prognose verbessern ließe.

In den Suppressionsassays konnte in vitro bestätigt werden, dass Tregs die Effektor-T-Zellen in ihrer Proliferation hemmen. Die Treg-Zahl ist im Aszites deutlich erhöht. Die gleichzeitig erniedrigte CD4 $^{+}$  T-Zell Zahl kann durch eine Treg Suppression erklärt werden.

Hohe Level an immunsuppressiven Tregs im Ovarialkarzinom gehen mit einer schlechten Prognose einher (Curiel et al. 2004). Ein hoher CD8 $^{+}$ /Treg Quotient begünstigt die Prognose (Sato et al. 2005). Die Inhibition der IFN $\gamma$ -Expression und Proliferationsfähigkeit von Effektor-T-Zellen ist ein bekannter Mechanismus der Immunsuppression durch Tregs. Warum die Frequenz der Effektor-T-Zellen und der

## Diskussion

Tregs im Aszites nicht mit der Prognose korreliert, wie es bei Proben von soliden Tumoren der Fall ist bleibt, offen.

Obwohl der Aszites beim Ovarialkarzinom Ausdruck einer tumorassoziierten Inflammation ist, bleibt somit eine verstärkte Effektor-T-Zell Antwort aus. CD4+ Effektor-T-Zellen steigern im Aszites zwar ihre IFN $\gamma$  Expression, kommen dort aber trotz erhöhter Proliferationskapazität in geringeren Konzentrationen vor als im peripheren Blut. Die Zahl CD8+ Effektor-T-Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen Aszites und peripherem Blut. Hohe Level von Effektor-T-Zellen im Aszites sind nicht mit der Prognose assoziiert. Auch wenn sich keine Tendenz zu einem Überlebensvorteil zeigte, könnte eine Reevaluation der Ergebnisse mit einem größeren Patientenkollektiv neue Hinweise liefern. Die immunsuppressiven Mechanismen sollten noch näher aufgeschlüsselt werden, um auch beim Ovarialkarzinom zukünftig Immuntherapien etablieren zu können.

### 5.5 TH17- UND EFFEKTOR T-ZELLEN IM KONTEXT DER TUMORGENESE

Auch wenn die genauen Zusammenhänge noch weitestgehend unklar sind, kann davon ausgegangen werden, dass die von Effektor-T-Zellen ausgelöste antitumoröse Immunantwort durch TH17-Zellen moduliert wird. Ob die durch TH17-Zellen beim Ovarialkarzinom hervorgerufene Wirkung auf die Effektor-T-Zell Antwort eher supprimierend oder aktivierend ist, wird derzeit kontrovers diskutiert. Diese Arbeit beschäftigt sich aus diesem Grund in Korrelationsanalysen mit der Frage, ob TH17-Zellen mit Effektor-T-Zellen und deren IFN $\gamma$ -Expression bzw. Proliferationskapazität im Aszites assoziiert sind.

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben zeigen gleich viele TH17-Zellen im Aszites und im peripheren Blut. Im Aszites besteht eine positive Korrelation sowohl zu den CD4+ als auch den CD8+ IFN $\gamma$ -exprimierenden Effektor-T-Zellen. Zusätzlich konnte in der Subgruppenanalyse gezeigt werden, dass dieser Zusammenhang nur im CD163<sup>low</sup> Milieu signifikant ist. TH17-Zellen wirken demnach in Anwesenheit von CD163<sup>low</sup> TAMs positiv auf die Effektor-T-Zell Antwort und somit antitumorös. Die fehlende Korrelation im CD163<sup>high</sup> Milieu spricht dafür, dass TH17-Zellen alleine dort keine Auswirkungen auf

## Diskussion

Effektorzellen haben, sondern stattdessen CD163<sup>high</sup> TAMs oder andere lösliche Mediatoren die Immunantwort der Effektorzellen regulieren. Die beschriebene Assoziation zwischen TH17-Zellen und den IFN $\gamma$ -exprimierenden T-Zellen könnte also insbesondere im CD163<sup>low</sup> Tumormilieu ein wichtiger Teil der antitumorösen Immunantwort sein, sollten sich die Ergebnisse in funktionellen Assays bestätigen lassen.

Wie bereits beschrieben, ist keins der T-Zell Subsets direkt zur klinischen Progression assoziiert. Erkenntnisse zur Interaktion der T-Zell Subsets stammen zum Großteil aus Versuchen, in denen quantitative Analysen mit Mäusen durchgeführt wurden. Einige dieser Studien zeigen, dass bei IL-17<sup>-/-</sup> sowie IL-17<sup>-/-</sup> IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> doppelt Knockout-Mäusen das Tumorstadium inhibiert ist und TH17-Zellen somit protumörös wirken (He et al. 2010; Wang et al. 2013). Einfach IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse hatten ein verstärktes Tumorstadium, woraus die Autoren schlossen, dass TH17-Zellen auch IFN $\gamma$ -unabhängig die Effektorzellen supprimieren. Andere Daten zeigen hingegen, dass bei IL-17<sup>-/-</sup> Mäusen die Zahl IFN $\gamma$  produzierender Effektor-T-Zellen simultan reduziert ist, was zu vermehrtem Tumorstadium führt (Kryczek et al. 2009b). Auch Versuche an Mäusen, denen der Transkriptionsfaktor Ror $\gamma$  fehlte, unterstützen die Annahme, dass TH17-Zellen die Rekrutierung von Effektor T-Zellen begünstigen und somit die antitumoröse Antwort fördern (Nunez et al. 2012). Die Applikation von TH17-Zellen in Tumorgewebe kann sogar die Zahl IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen und die spezifische Immunantwort auf Tumorzellen verstärken (Martin-Orozco et al. 2009; Benchetrit et al. 2002). Auch speziell für das Ovarialkarzinom bei Mäusen bestehen Hinweise darauf, dass eine Immunantwort der Effektor-T-Zellen durch den Co-Transfer von TH17-Zellen deutlich verstärkt und verlängert werden kann (Kryczek et al. 2011). Darüber hinaus zeigen Daten beim Menschen, dass TH17-Zellen TH1-Chemokine durch IL-17 aktivieren. IL-17 induziert beim Ovarialkarzinom synergistisch mit IFN $\gamma$  die Expression von CXCL9 und CXCL10, was zu einer CD8<sup>+</sup> T-Zell Rekrutierung ins Tumormilieu führt. Dementsprechend korreliert im malignen Aszites die IL-17 Konzentration positiv mit der Frequenz infiltrierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Kryczek et al. 2009b), wie in den durchgeführten Versuchen bestätigt werden konnte. TH17-Zellen sind so durch eine Effektor-T-Zell Aktivierung an der Immunabwehr gegen den Tumor beteiligt.

## Diskussion

Es bestehen erstmalig Hinweise darauf, dass TH17-Zellen insbesondere zusammen mit CD163<sup>low</sup> TAMs antitumorös wirken, indem sie die Effektor-T-Zell Antwort induzieren. Warum hingegen im CD163<sup>high</sup> Milieu keine Aktivierung von Effektor-T-Zellen durch TH17-Zellen erfolgt, bleibt offen und sollte in Folgestudien entschlüsselt werden. Sollte sich diese Hypothese in funktionellen Assays durch Co-Kulturexperimente bestätigen lassen, könnte basierend darauf in Zukunft eine Immuntherapie entwickelt werden, in der es durch eine verbesserte TH17- und Effektor-T-Zell Interaktion zu einer effektiveren, antitumorösen Immunantwort kommt.

### 5.6 KORRELATION ZWISCHEN TAM-PHÄNOTYP UND EFFEKTOR-T-ZELLEN

Effektor-T-Zellen können zwar effektiv Tumoren bekämpfen, werden aber im Tumormikromilieu oft supprimiert. Der Aszites beim Ovarialkarzinom enthält neben anderen suppressiven Immunzellen viele TAMs, die über verschiedene Mechanismen die Immunantwort der Effektor-T-Zellen hemmen (Loercher et al. 1999). Unabhängig von der direkten Antigenpräsentation über MHC-Moleküle sind Chemokine ein wesentlicher Teil der Amplifikations- und Regulationssysteme von polarisierten T-Zell Antworten. Die Identifikation von Chemokinen, die bei der Effektor-T-Zell Suppression beteiligt sind, ist wichtig, um Tumor-Escape-Mechanismen beim Ovarialkarzinom zu entschlüsseln.

Das inflammatorische Zytokin IFN $\gamma$  wird von T-Zellen gebildet und induziert klassische M1-Marker wie die Fc  $\gamma$  -Rezeptoren CD32, CD64, IL-12 und das Chemokin CCR7 auf Makrophagen. M1-TAMs wirken proinflammatorisch und können IL-12 vermittelt wiederum die Proliferation und Zytotoxizität von vor allem TH1-Zellen induzieren. IFN $\gamma$  supprimiert die Expression klassischer M2-Marker wie CD163. Die Polarisierung zu CD163<sup>high</sup> CD206<sup>high</sup> M2-TAMs wird vor allem von den Zytokinen IL-4, IL-10 und IL-13 getriggert, denen eine immunsuppressive Wirkung u.a. auf die zytotoxische T-Zell-Antwort zugeschrieben wird (Mantovani et al. 2002).

Die Subgruppenanalyse zeigt, dass eine Assoziation zwischen Proliferationsfähigkeit der Effektor-T-Zellen und dem prädominantem TAM-Subset im Aszites besteht. Beide Effektor-T-Zell Gruppen aus CD163<sup>high</sup> Proben proliferierten stärker als im CD163<sup>low</sup>

## Diskussion

Subset. Zusätzlich ist die Proliferationskapazität beider T-Zell-Linien im Gesamtkollektiv und den CD163<sup>high</sup> Proben neben CD163 auch positiv mit CD206 und zu CD68 assoziiert. Da sich die Zellkonzentration im Aszites aber nicht von der im peripheren Blut unterscheidet, ist davon auszugehen, dass die suppressive Mechanismen, die eine Effektor-T-Zell Expansion verhindern, im Tumormilieu überwiegen.

Im CD163<sup>high</sup> Subset supprimieren die klassischen Marker CD163 und CD206 die IFN $\gamma$ -Expression durch CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen und der Proliferationskapazität von CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen im Gesamtkollektiv. IL-12 hat pleiotrophe Effekte auf verschiedene Immunzellen und hat neben einer immunstimulierenden z.T. auch eine tumorfördernde Wirkung (Lenzi et al. 2007). Ergebnisse, wonach hohe IL-12 Level mit einer schlechten Prognose einhergehen (Zeimet et al. 1998), bestätigten sich nicht in der durchgeführten Parallelstudie (Reinartz et al. 2013). Hohe IL-12 Konzentrationen im Aszites steigern zumindest das Risiko für ein Ovarialkarzinom (Clendenen et al. 2011). In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass hohe IL-12 Level immunstimulierend wirken und Teil der antitumorösen Immunantwort durch Effektor-T-Zellen sind.

Die IL-12 Konzentration in Makrophagen korreliert positiv zur IFN $\gamma$ -Expression durch CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen und der Proliferationskapazität von CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen im Gesamtkollektiv. IL-12 hat pleiotrophe Effekte auf verschiedene Immunzellen und hat neben einer immunstimulierenden z.T. auch eine tumorfördernde Wirkung (Lenzi et al. 2007). Ergebnisse, wonach hohe IL-12 Level mit einer schlechten Prognose einhergehen (Zeimet et al. 1998), bestätigten sich nicht in der durchgeführten Parallelstudie (Reinartz et al. 2013). Hohe IL-12 Konzentrationen im Aszites steigern zumindest das Risiko für ein Ovarialkarzinom (Clendenen et al. 2011). In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass hohe IL-12 Level immunstimulierend wirken und Teil der antitumorösen Immunantwort durch Effektor-T-Zellen sind.

In der CD163<sup>low</sup> Gruppe korrelieren sowohl CCR7 als auch HLA-DR negativ zur IFN $\gamma$ -Expression durch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen. Die Ergebnisse liefern somit einen Hinweis auf eine neue immunsuppressive CD163<sup>low</sup> CCR7<sup>high</sup> HLA-DR<sup>high</sup> Makrophagen-Subgruppe, die negative Auswirkungen auf die IFN $\gamma$ -Expression hat.

Die IL-10-Expression im CD163<sup>low</sup> Subset ist positiv zur CD4<sup>+</sup> und in der Gesamtpopulation zur CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zell Proliferation assoziiert. IL-10 gilt als immunsuppressiv und korreliert invers mit dem progressionsfreiem Überleben (Reinartz et al 2013). In Co-Kulturen mit Ovarialkarzinom-Zellen aus Aszites wirkt IL-10 sogar hemmend auf die IFN $\gamma$  Expression und die Proliferation von T-Zellen (Loercher et al. 1999). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass IL-10 speziell in CD163<sup>low</sup>

## Diskussion

Makrophagen Subsets einen gegenteiligen Effekt auf die T-Zell Antwort ausübt, was in Co-Kulturen bestätigt werden sollte.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass  $CD163^{high} CD206^{high}$  TAMs im Aszites die Effektor-T-Zell Antwort supprimieren und somit protumorös wirken könnten. Daneben wurde ein neues  $CD163^{low} CCR7^{high} HLA-DR^{high}$  Makrophagen Subset identifiziert, welches ebenfalls an der Inhibition der Effektor-T-Zell Antwort beteiligt zu sein scheint. Eine induzierende Wirkung auf die Immunantwort durch Effektor-T-Zellen haben allgemein IL-12 und IL-10. Die Interaktion von Effektor-T-Zellen und Makrophagen scheint wesentlich von der CD163-Polarisierung abzuhängen. Der nächste Schritt zur Entschlüsselung der komplexen Wechselwirkungen sollte die Evaluation der Ergebnisse in Co-Kulturen sein. Darin sollten die IFN $\gamma$  Expression und Proliferationskapazität der T-Zellen in Anwesenheit der Makrophagensubsets geprüft werden.

### 5.7 KRITIK DER METHODIK

Bei der Interpretation der gewonnenen Erkenntnisse muss das vergleichsweise kleine Patientenkollektiv von 20 Patientinnen begleitend berücksichtigt werden. Das Ovarialkarzinom wird nur selten in frühen Stadien diagnostiziert, sodass sich die Rekrutierung der Probanden auf high-grade Karzinome konzentrierte, um die angestrebte Probandenzahl zu erreichen. Dafür waren die Proben gut vergleichbar und es konnte eine sehr große Zahl verschiedener Immunzellen und Zytokine erstmalig systematisch untersucht werden. In die Überlebenszeitanalyse konnten nur 14 der 20 Patientinnen inkludiert werden und die Zeitspanne der klinischen Nachbeobachtung von im Mittel 14,5 Monaten war relativ kurz. Eine Beurteilung der Ergebnisse kann von daher nur mit Vorsicht erfolgen. Die bestehenden Tendenzen im Bereich niedriger Signifikanzniveaus sind somit nur eingeschränkt beurteilbar, sodass es sich lohnt, eine Reevaluation zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführen.

Obwohl durch das Vorkommen von zahlreichen Zytokinen und Immunzellen der Aszites dem Tumormilieu ähnelt, bestehen wesentliche Unterschiede zwischen den beiden Tumormilieus. Ergebnisse an anderen Tumormodellen können zwar überprüft werden, ein interpretativer Vergleich der Studien ist aber nicht möglich.

## Diskussion

Die Akquisition von Aszites- und Blutproben ist leicht reproduzierbar, doch durch die vergleichsweise geringen Zellkonzentrationen der Minor-Subpopulationen wie TH17-Zellen und Tregs steigt die Fehleranfälligkeit bei der Verarbeitung der Proben. Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit wurde mit cryokonserviertem Probenmaterial gearbeitet. Allgemein sind die Zellen bei in-vitro Versuchen empfindlicher, da sie großem mechanischem und termischem Stress ausgesetzt werden. Zusätzlich ist die Stimulierbarkeit meist schlechter als bei frisch isolierten Zellen. Die wesentlichen Erkenntnisse dieser umfangreichen Analysen sollten somit in einem nächsten Schritt in ergänzenden Studien vertieft werden, um die statistischen Zusammenhänge durch funktionelle Assays zu verifizieren.

### 5.8 FAZIT UND AUSBLICK

Die Studienergebnisse weisen auf Assoziationen zwischen TH17-Zellen, TAMs und der Effektor-T-Zell Antwort hin. Dabei gab es erste Hinweise darauf, dass die CD163 Expression auf TAMs sich auf die Konzentration der T-Zell Subsets im Aszites auswirkt. TH17-Zellen scheinen die Effektor-T-Zell Antwort zu fördern und somit antitumorös zu wirken und hohe Frequenzen an TH17-Zellen im Aszites könnten einen positiven Einfluss auf das rezidivfreie Überleben der Patientinnen haben.

Trotz optimaler Therapie ist die Prognose beim Ovarialkarzinom immer noch schlecht. Das aggressive Wachstum der Tumorzellen geht oft mit peritonealer Metastasierung und Chemoresistenz einher. Deswegen wird viel auf die Entwicklung alternativer Therapiekonzepte wie einer spezifischen Immuntherapie gesetzt. Dazu gehören die Vakzinierung mit Tumorpeptiden, der T-Zell Transfer und die Applikation von Zytokinen oder Antikörpern. Auch wenn einige Studien an Mausmodellen bereits die Wirkung einer Immuntherapie auf die Tumorprogression beim Ovarialkarzinom belegen konnten, ist eine Einbeziehung solcher Therapieverfahren in die Standardbehandlung in naher Zukunft nicht zu erwarten. Ein grundsätzliches Problem ist die Unklarheit hinsichtlich von Langzeitfolgen bei der Behandlung mit Immunmodulatoren. Zudem sind die Regulationsmechanismen zwischen Tumor und Immunsystem hochkomplex und dynamisch im Verlauf der Erkrankung. Therapien mit nur einem Ansatz haben daher oft nur eine geringe Wirkung und sind häufig mit



## Diskussion

schweren Nebenwirkungen verbunden. Immunmodulatoren müssen von daher kombiniert und individuell angepasst werden. Ein gezieltes Eingreifen in die Mechanismen der Tumorumöostase setzt ein detailliertes Verständnis der Wechselwirkungen zwischen dem Tumor und den Immunzellen voraus. Moderne Verfahren aus dem Bereich der Proteomik und Gentechnologie haben das Potential, die Entschlüsselung der molekularen Zusammenhänge nachhaltig zu beschleunigen.

Ein vertiefendes Verständnis für die in den Korrelationsanalysen gewonnenen Erkenntnisse zu entwickeln stellt ein erfolgsversprechendes Forschungsziel dar. Sinnvoll wäre es, Co-Kulturen der identifizierten Makrophagen und T-Zell Subsets anzulegen, um anschließend das Wachstumsverhalten und die Expression einzelner Zytokine zu analysieren. Die Wirkung von Antikörpern gegen beispielsweise CD163 sollte am Tiermodell getestet werden. Daraus könnten Möglichkeiten zu einer gezielten Immuntherapie beim Ovarialkarzinom resultieren. Die Hypothese, dass sich hohe Frequenzen von TH17-Zellen im Aszites positiv auf das progressionsfreie Überleben auswirken, sollte in größeren Studien verifiziert werden. Zudem sollten andere Immunzellsubsets und lösliche Mediatoren mit potenzieller Auswirkung auf die Prognose im Aszites identifiziert werden. In Kombination könnte sich daraus die Prognoseeinschätzung beim Ovarialkarzinom deutlich verbessern lassen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ovarialkarzinom entwickelt sich lange unbemerkt und wird meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, in dem bereits Peritonealmetastasen und maligner Aszites auftreten. Welche Mechanismen dazu führen, dass in der Pathogenese zwar eine tumorassoziierte Inflammation, aber keine effektive Immunantwort entsteht, ist bislang noch nicht völlig geklärt. Insbesondere die protumoröse sowie antitumoröse Wirkung inflammatorischer Immunzellsubsets wird in diesem Zusammenhang kontrovers diskutiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion von TAMs, TH17-Zellen, Effektor-T-Zellen und Tregs bei 20 Patientinnen mit high-grade serösem Ovarialkarzinom zu untersuchen und deren Auswirkung auf das progressionsfreie Überleben zu evaluieren. Die Konzentrationen der TAM- und T-Zellsubsets wurden über verschiedene Oberflächenmarker sowie ausgewählter, intrazellulärer Marker wie Zytokine (insbesondere IL-17 und IFN $\gamma$ ) im Aszites und zum Vergleich im peripheren Blut bestimmt. In Funktionsassays wurden die Proliferationskapazität von Effektor T-Zellen und die Suppression durch Tregs bestimmt. Da bereits im Vorfeld gezeigt werden konnte, dass das Vorkommen von CD163<sup>low</sup> TAMs im Aszites mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, erfolgte zusätzlich eine Subgruppenanalyse der T-Zellsubsets in Patienten mit CD163<sup>low</sup> und CD163<sup>high</sup> TAMs. Die Ergebnisse wurden statistisch analysiert und auf signifikante Korrelationen untersucht. Suppressiv und aktivierende Mechanismen sollten somit aufgedeckt werden, um daraus Rückschlüsse hinsichtlich der Tumorentwicklung ziehen zu können.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass TH17-Zellen positiv mit der CD163 Expression auf TAMs im Aszites assoziiert sind. Aszitesproben mit prädominanten CD163<sup>low</sup> TAMs enthielten dementsprechend deutlich weniger TH17-Zellen als das periphere Blut. Auch die Zahl der CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen war im Aszites reduziert. Dagegen war die Proliferationsfähigkeit und IFN $\gamma$  Expression als Zeichen der antitumorösen Immunantwort bei CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen im Aszites erhöht. Die IFN $\gamma$  Expression korrelierte signifikant mit der Frequenz der TH17-Zellen. Im CD163<sup>low</sup> Subset war diese Assoziation besonders stark. Im CD163<sup>high</sup> Subset war die IFN $\gamma$  Expression negativ zur

## Zusammenfassung

CD163 und CD206 Expression auf TAMs assoziiert. Tregs supprimierten signifikant Effektor T-Zellen, aber nicht TH17-Zellen. Aszitesproben mit einer hohen TH17-Zell Frequenz korrelierten tendenziell positiv mit dem progressionsfreien Überleben.

Allgemein gehen hohe Level von CD163 auf TAMs mit einer schlechten Prognose einher. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass über CD163 und CD206 die Effektor-T-Zellantwort inhibiert wird. Unsere Ergebnisse zeigen darüber hinaus eine positive Assoziation zwischen CD163 und den TH17-Zellen. Andererseits scheinen TH17-Zellen die IFN $\gamma$  Expression in Effektor-T-Zellen zu induzieren und somit vor allem antitumorös zu wirken. Tendenziell besteht zudem bei Patientinnen mit hohen TH17-Zell Konzentrationen im Aszites ein verbessertes progressionsfreies Überleben. Sie scheinen insgesamt also eher antitumorigen zu wirken. Wahrscheinlich eignen sich TH17-Zellen nicht allein als prognostischer Marker, aber unter Umständen in Kombination mit anderen Immunzellsubsets oder löslichen Mediatoren im Aszites. Mögliche Zusammenhänge zwischen dem TAM-Polarisierungszustand und unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen sollten in funktionalen Assays untersucht werden und könnten Grundlagen für die Entwicklung von neuen Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten beim Ovarialkarzinom liefern.

## 7 ABSTRACT

Ovarian cancer is usually diagnosed at an advanced stage of disease often with peritoneal metastasis and malignant ascites. Tumor microenvironment and immunologic interactions are a key component of tumorigenesis. Different models suggest an immune escape mechanism, which prevents some tumors from cytotoxic effects by the host's immune system. It is still not clear which mechanisms are responsible for prevention of an effective immune response. In particular, the exact immunologic function of TH17 cells during tumor progression remains largely unknown.

To create further insight on these mechanisms, we studied the interactions of tumor-associated macrophages (TAM), TH17-cells, effector T-cells and regulatory T-cells (Treg) in ovarian cancer patients. Furthermore we evaluated their prognostic value for relapse free survival (RFS). The concentration of macrophages and the various T-cell-populations were investigated in ascites and peripheral blood of 20 patients suffering from high grade serous ovarian carcinoma. Various surface markers and cytokines (especially IL-17 and IFN $\gamma$ ) were evaluated by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). In functional assays the proliferative capacity of effector T-cells and the suppression by Tregs was quantified. Due to the poorer prognosis of patients with CD163<sup>low</sup> in ascetic fluid, a subgroup analysis of T cell subsets in patients with CD163<sup>low</sup> and CD163<sup>high</sup> TAMs was carried out. The results were tested for significant correlations by statistical analysis. Their impact on prognosis was studied by survival analysis. Suppressive and promoting mechanisms should be revealed to enhance the understanding of the tumor development.

Our findings suggest that TH17-cells are positively associated with the CD163 expression on TAMs in ascites. Consistent with these findings, the concentration of TH17-cells was reduced in ascites from CD163<sup>low</sup> patients compared to peripheral blood as well as the number of CD4<sup>+</sup> T-helper cells. However, the proliferative capacity and IFN $\gamma$  expression of CD4<sup>+</sup> T-helper cells in ascites was increased. The IFN $\gamma$  expression correlated positively to the frequency of TH17-cells, especially in the

## Abstract

CD163<sup>low</sup> subset. In the CD163<sup>high</sup> subset in contrast IFN $\gamma$  expression was negatively associated to the CD163 and CD206 Expression on TAMs. In ascites Tregs suppressed significant effector T-cells but not TH17-cells. High concentrations of TH17-cells in ascites tend to correlate positively to RFS.

Overall high levels of CD163 show an inverse correlation to RFS. One possible explanation could be the suppression of the effector-T-cell response by CD163 together with CD206. Our results show furthermore a positive association between CD163 and TH17-cells. However, TH17 cells seem to display an antitumor immune response by inducing the IFN $\gamma$  expression in effector-T-cells and to have a positive impact on RFS. Probably TH17-cells are not suitable as a solitary prognostic marker but in combination with other immunocytological subsets or soluble mediators in ascites.

Possible correlations between the states of TAM polarization and the different T cell subpopulations should be tested in functional assays and could provide a basis for the development of new diagnostic and therapeutic options in ovarian cancer.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Aarvak, T. et al., 1999. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *J Immunol*; 162:1246–51.

Auersperg, N. et al., 1997. Ovarian Carcinogenesis and the Biology of Ovarian Surface Epithelium. *Journal of cellular Physiology*; 173:261–265.

Akila, P. et al., 2012. CD163 and its expanding functional repertoire. *Clinica Chimica Acta*; 413:669–674.

Alvero AB. et al., 2012. Distinct subpopulations of epithelial ovarian cancer cells can differentially induce macrophages and T regulatory cells toward a pro-tumor phenotype. *Am J Reprod Immunol*; 67: 256–265.

Bamias, A. et al., 2007. Significant differences of lymphocytes isolated from ascites of patients with ovarian cancer compared to blood and tumor lymphocytes. Association of CD3+CD56+ cells with platinum resistance. *Gynecol Oncol*; 106:75–81.

Benchetrit F. et al. 2002, Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell dependent mechanism. *Blood*; 99:2114–2121.

Bilate, A.M. et Lafaille, J.J., 2012. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu. Rev. Immunol*; 30, 733–758.

Buechler, C. et al., 2000. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.*; 67:97–103.

Bui, J.D. et Schreiber RD., 2007. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol.* ; 19:203–208.

Cassetta, L. et al., 2011. Macrophage Polarization in Health and Disease, *The Scientific World Journal*; 11:2391–2402.

Charles, K.A. et al. 2009. The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest.*; 119(10):3011–3023.

Chaudhry, A. et al., 2009. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*; 326, 986–991.

Chen, X. et al. 2010. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer*; 69:348-354.

- Clarke, B. et al., 2009. Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Modern Pathology*; 22(3): p. 393-402.
- Cohen, J.G. et al. 2014. In 2014, can we do better than CA125 in the early detection of ovarian cancer? *Worl J Bio Chem*; 5(3): 286-300.
- Tess, V. et al., 2011. Circulating Inflammation Markers and Risk of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 20(5): 799–810.
- Cramer, D.W. et Welch, W.R., 1983. Determinants of ovarian cancer risk: II, inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst*; 71:717-21.
- Cua, D.J. et Tato C.M., 2010. Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol.*; 10(7):479–489.
- Curiel, T.J. et al., 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.*;10:942–9.
- Domingues, H.S. et al., 2010. Functional and pathogenic differences of Th1 and TH17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE*; 5:e15531.
- DeRycke, M. et al., 2013. Toward understanding the genetics of regulatory T cells in ovarian cancer. *OncolImmunology* Vol. 2, Iss. 6.
- Djemadji-Oudjil, N. et al., 1996. Immunohistochemical identification of type II alternatively activated dendritic macrophages (RM 3/1+3, MS-1+/-, 25F9-) in psoriatic dermis. *Arch Dermatol Res*; 288:757–64.
- Dranoff, G., 2013. Immunotherapy at large: Balancing tumor immunity and inflammatory pathology. *Nat Med.*; 19(9):1100–1101.
- Droeser, R.A. et al., 2013. High IL-17-positive tumor immune cell infiltration is indicative for chemosensitivity of ovarian carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*; 139:1295–1302.
- El-Behi, M. et al., 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol.*; 12(6):568–575.
- Fathalla M.F., 1971 Incessant ovulation-a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*; 2:163.
- Facciabene, A. et al., 2011. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*; 475, 226–230.
- Flesken-Nikitin, A. et al., 2003. Induction of Carcinogenesis by Copncurrent Inactivation of p53 and Rb1 in the Mouse Ovarian Surface Epithelium. *Cancer Res*; 63:3459-3463.
- Garrido, F. et al. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I

phenotypes in human tumours. *Immunol Today*; 18:89–95.

Gilks, C.B., 2004. Subclassification of ovarian surface epithelial tumors based on correlation of histologic and molecular pathologic data. *Int J Gynecol Pathol*; 23(3):200–205.

Grivennikov, S.I. et al. 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*; 140:883–899.

Goyne, H.E. et al. 2014. Ovarian tumor ascites CD14+ cells suppress dendritic cell-activated CD4+ T-cell responses through IL-10 secretion and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Immunother*; 37(3):163–169.

Hamanishi, J. et al., 2007. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104:3360–3365.

He, D. et al., 2010. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.*; 184(5): 2281–2288.

Hemdan, N.Y., et al. 2012. Key molecules in the differentiation and commitment program of T helper 17 (TH17) cells up-to-date. *Immunol Lett*; doi10.1016/09.007.

Hemdan, N.Y. et al., 2010. Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev*; 9:785–792.

Hicklin, D.J. et al. 1999. Class I. antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today*; 5:178–86.

Hot, A. et al. 2012 IL-17 and tumour necrosis factor  $\alpha$  combination induces a HIF-1 $\alpha$  dependent invasive phenotype in synoviocytes. *Ann Rheum Dis*; 71:1393–1401.

Hsieh, C.S. et al., 2012. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.*; 12, 157–167.

Huber, S. et al., 2011. TH17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3 and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity*.; 34(4):554–565.

Hussain, S.P. et al. 2003. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer*; 3:276–285.

Igney, F.H. et Krammer P.H., 2002. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol*; 71:907–20.

Kato, T. et al., 2001. Expression of IL-17 mRNA in Ovarian Cancer. *Department of Obstetrics and Gynecology, University of Tokushima, School of Medicine*; 3-18-15.

Kawamura, K. et al., 2009. Detection of M2 macrophages and colonystimulating factor



1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathol. Int.*; 59, 300–305.

Kim, D.Y. et al., 2009. STAT3 expression in gastric cancer indicates a poor prognosis. *J Gastroenterol Hepatol*; 24:646-651.

Kim, D.W. et al., 2008. High tumour islet macrophage infiltration correlates with improved patient survival but not with EGFR mutations, gene copy number or protein expression in resected non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer*; 98, 1118–1124.

Koch, M.A. et al., 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.*; 10, 595–602

Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.. Empfehlungen für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren, Aktualisierte Empfehlungen der Kommission Ovar auf Grundlage der S2k Leitlinie (Version 1.0, Mai 2007)

Kommos, F. et Tanner, B. 2009. Pathologie und Konsequenzen für die Klinik: Histologische Tumortypen. Gehalten auf dem Symposium "State-of the-Art Ovar" der Kommission Ovar der AGO in München am 17.06.2009.

Kryczek, I. et al., 2007a. Cutting edge: TH17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol*; 178:6730-6733.

Kryczek, I. et al., 2007b. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 67, 8900–8905.

Kryczek, I. et al., 2009a. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of TH17 cells in the human tumor environments. *Blood*; 114:1141-1149.

Kryczek, I. et al., 2009b. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood*; 114: 357–359.

Kryczek, I. et al., 2011. Human TH17 cells are long-lived effector memory cells. *Sci Transl Med*; 3:104ra0.

Kuang, D.M. et al., 2010.a Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma promote expansion of memory T helper 17 cells. *Hepatology*; 51:154-164.

Kuang, D.M. et al., 2010b. Tumor-activated monocytes promote expansion of IL-17-producing CD8+ T cells in hepatocellular carcinoma patients. *J Immunol*; 185:1544-1549.

Kurman, R.J. et al., 2008. Early detection and treatment of ovarian cancer: shifting from early stage to minimal volume of disease based on a new model of carcinogenesis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*; 198:351-356

Lan, C. et al. 2013 Expression of M2-Polarized Macrophages is Associated with Poor Prognosis for Advanced Epithelial Ovarian Cancer. *Technol Cancer Res Treat.*; 12, 259-267.

Langowski, J.L. et al. 2006. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*; 442:461–465.

Lee, S.-J. et al., 2009 Clinical Characteristics of Metastatic Tumors to the Ovaries. *J Korean Med Sci.*; 24(1): 114–119.

Leeper, K. et al., 2002 Pathologic findings in prophylactic oophorectomy specimens in high-risk women. *Gynecol Oncol*; 87: 52–56.

Lenzi, R. et al., 2007. Phase II study of intraperitoneal recombinant interleukin-12 (rhIL-12) in patients with peritoneal carcinomatosis (residual disease < 1 cm) associated with ovarian cancer or primary peritoneal carcinoma. *Journal of Translational Medicine*; 5:66 doi:10.1186/1479-5876-5-66.

Lin, A.M. et al., 2011. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol.*; 187(1):490–500.

Loercher, A. et al., 1999. Identification of an IL-10-Producing HLA-DR-Negative Monocyte Subset in the Malignant Ascites of Patients with Ovarian Carcinoma That Inhibits Cytokine Protein Expression and Proliferation of Autologous T Cells<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology*; December 1, vol. 163 no. 11 6251-626.

Ma, Y. et al., 2011. Contribution of IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med*; 208:491-503.

Maniati, E. et al., 2010. Up for Mischief? IL-17/TH17 in the tumour microenvironment. *Oncogene*; 29:5653-5662.

Mantovani, A. et al. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*; 23:549-555.

Markman, M. et al., 1991. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol*; 9:389 –93.

De Martel, C. et Franceschi S., 2009. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*; 70:183–194.

Martin-Orozco, N. et al., 2009. T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity*; 31, 787–798.

Mhaweche-Fauceglia, P. et al., 2013. Intraepithelial T cells and tumor-associated macrophages in ovarian cancer patients. *Cancer Immunity*; 13:1-6.

Mills, C.D. et al., 2000. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.*; 164:6166-6173

Miyara, M. et al., 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*; 30:899–911.

Miyahara, Y. et al., 2008. Generation and regulation of human CD4<sup>+</sup> IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 105: 15505–15510.

Moore, R.G. et al. 2009. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology*; 112(1): 40-46.

Movahedi, K. et al., 2008. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*; 111: 4233–4244.

Mueller-Kliesser, W., 2010. Das Tumormikromilieu. *Nuklearmedizin*; 16-20.

Munegowda, M. et al., 2011. TH17 and TH17-stimulated CD8<sup>+</sup> T cells play a distinct role in TH17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother*; 60:1473-1484.

Muranski, P. et al., 2008. Tumorspecific TH17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*; 112:362-373.

Ness, R.B. et Cottreau C., 1999 Possible Role of Ovarian Epithelial Inflammation in Ovarian Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*; 91:1459-1467.

Nolen, B. et al., 2009. A serum based analysis of ovarian epithelial tumorigenesis. *Gynecol Oncol*; 112(1):47–54.

Novitskiy, S.V. et al., 2011. TGF- $\beta$  receptor II loss promotes mammary carcinoma progression by TH17 dependent mechanisms. *Cancer Discov*; 1:430-441.

Novitskiy SV. et al., 2012. Deletion of TGF- $\beta$  signaling in myeloid cells enhances their anti-tumorigenic properties. *J Leukoc Biol*; 92:641-651.

Núñez, S. et al., 2012. T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. *Immunology*; 139, 61-71.

Orsulic, S. et al., 2002. Induction of ovarian cancer by defined multiple genetic changes in a mouse model system. *Cancer Cell*; 1:53-62.

Pickens, S.R. et al., 2010. IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol*; 184:3233-3241.

Piek, J.M. et al., 2004. Intraperitoneal serous adencarcinoma: a critical appraisal of three hypotheses on its cause. *AM J Obstet Gynecol*; 191;3: 718-32.

Piovano, E. et al., 2014 The Role of HE4 in Ovarian Cancer Follow-up. *Int J Gynecol Cancer*; 24: 1359-1365.

Punt, S. et al., 2015. The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patients survival: a systematic review. *Oncoimmunology*; Vol.4, Iss. 2.

Quesnel, B., 2008. Tumor dormancy and immunoescape. *APMIS*; 116:685–94.

Radosavljevic, G. et al., 2010. Interleukin-17 may be a valuable serum tumor marker in patients with colorectal carcinoma. *Neoplasma*; 57:135-144.

Reinartz, S. et al., 2013. Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: Correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse. *Int. J. Cancer*; 00:3-11.

Saldova, R. et al., 2007. Ovarian cancer is associated with changes in glycosylation in both acute-phase proteins and IgG. *Glycobiology*; 17: 1344–1356.

Salvesen, H.B. et Akslen, L.A., 1999. Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int. J. Cancer*; 84, 538–543.

Santin, A.D. et al., 2001. Phenotypic and functional analysis of tumor-infiltrating lymphocytes compared with tumor-associated lymphocytes from ascitic fluid and peripheral blood lymphocytes in patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest*; 51:254–61.

Savage, P.A. et al., 2013. Basic principles of tumor associated regulatory tcell tumor biology. *trends in immunology*; 34:33-40.

Sato, E. et al., 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102:18538.

Serrafini, P. et al., 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: Recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Seminars in Cancer Biology*; 16:53-65.

Shevach, E.M., 2006. From vanilla to 28 flavors: Multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*; 25(2):195-201.

Smyth, M.J. et al., 2006. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.*; 90:1–50.

Su, X. et al., 2010. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human TH17 cells. *J Immunol*; 184:1630-1641.

Vergote, I.B. et al., 1992. Randomized trial comparing cisplatin with radioactive phosphorus or whole-abdomen irradiation as adjuvant treatment of ovarian cancer. *Cancer*; 69:741–9.

Tajima, M. et al., 2011. IL-17/IFN- $\gamma$  double producing CD8+ T (Tc17/IFN- $\gamma$ ) cells: a novel cytotoxic T-cell subset converted from Tc17 cells by IL-12. *Int Immunol*; 23:751-759.

Tatano, Y. et al., 2014. Unique Macrophages Different from M1/M2 Macrophages Inhibit T Cell Mitogenesis while Upregulating TH17 Polarization. *nature scientific reports*; 4:4146.

Tong, Z. et al., 2012. A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis. *PLoS ONE*; 7:e34959.

Torroella-Kouri et al., 2009. Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated. *Cancer Res*; 69: 4800-4809.

Tosolini, M. et al., 2011. Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, TH17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Res*; 71:1263-1271.

Wang, B. et al., 2013. Mast cells expressing interleukin 17 in the muscularis propria predict a favorable prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.*; 62(10): 1575–1585.

Wang, H.Y. et Wang, R.F., 2007. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 19:217–223.

Waldner, M.J. et Neurath, M.F., 2009. Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin. Immunopathol.*; 31:249–256.

Wilke, C.M. et al., 2011. TH17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis*; 32:643-649.

Wing, K. et S. Sakaguchi., 2010. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature Immunology*; 11(1): p. 7-13.

Woodruff, J.D. et Julian C.G., 1969. Multiple malignancies in the upper genital canal. *Am J Obstet Gynecol*; 93:810 –22.

Yamamoto, M. et al., 2009. Enhancement of anti-tumor immunity by high levels of Th1 and TH17 with a combination of dendritic cell fusion hybrids and regulatory T cell depletion in pancreatic cancer. *Oncol Rep*; 22:337-343.

Yang, S. et al., 2010. Foxp3+IL-17+ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer. *J. Leukoc. Biol.*; 89, 85–91,

Yigit, R. et al., 2010. Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination. *Gynecologic Oncology*; 117:366-372.

Zammaron, B.F. et Chen, WJ., 2011. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Developement and Progression. *Int. J. Biol. Sci.*; 7(5):651-658,

Zeimet, A.G. et al., 1998. Ascitic Interleukin-12 Is an Independent Prognostic Factor in Ovarian Cancer. *J Clin Oncol*; 16:1861-1868.

Zhang, L. et al., 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*; 348:203–13.

Zhang, M. et al, 2014. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *Journal of ovarian research*; 7:19.

Zhang, H.-Y. et H. Sun., 2010. Up-regulation of Foxp3 inhibits cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Cancer Letters*; 287(1): p. 91-97.

Zhang, Y. et al., 2011. The imbalance of TH17/Treg in patients with uterine cervical cancer. *Clin Chim Acta*; 412:894-900.

Zheng, Y. et al., 2009. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature*; 458, 351– 356.

Zhu, X. et al., 2008. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.*; 10(6):R95.

Zielinski, C.E. et al., 2012. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1 $\beta$ . *Nature.*; 484(7395):514–518.

Zitvogel, L. et al., 2008. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*; 8:59–73.

## 9 ANHANG

### 9.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1 Schematische Übersicht des Tumormikromilieus.....	11
Abbildung 1.2 Übersicht TH17 abhängiger Signalwege. ....	17
Abbildung 3.1 Übersicht zum Probenprozessing. ....	32
Abbildung 3.2 LSM 1077 Lymphozytenmedium.....	33
Abbildung 3.3 Formel zur Berechnung der Zellzahl.....	34
Abbildung 3.4 Schematische Darstellung des FACS-Prinzips.....	45
Abbildung 3.5 Dot-Plots der Treg-Phänotypisierung. ....	46
Abbildung 3.6 Auswertung der TH17 Phänotypisierung.....	48
Abbildung 3.7 Beispiel für ein CFSE Dot- und ein Histogramm-Plot. ....	50
Abbildung 4.1 Einteilung des Patientenkollektivs nach CD163-Expression in TAMs.....	52
Abbildung 4.2 Verteilung der TH17-Zellen.....	53
Abbildung 4.3 Korrelation von IL-17/CD163 im Aszites. ....	54
Abbildung 4.4 Assoziation von RFS und TH17-Konzentration.....	55
Abbildung 4.5 Korrelation von TH17-Zellen und Makrophagenmarkern.....	56
Abbildung 4.6 Verteilung der Effektor T-Zellen.....	58
Abbildung 4.7 Korrelation von Effektor-T- und TH17-Zellen im Aszites.. ....	60
Abbildung 4.8 Korrelation von Effektor-T- und TH17-Zellen im Blut. ....	61
Abbildung 4.9 Korrelation von Effektor-T-Zellen und Makrophagenmarkern.....	63
Abbildung 4.10 Assoziation von RFS und Effektor-T-Zellen. ....	64

## Anhang

Abbildung 4.11 Treg Verteilung und Suppression. ....	66
--	----

Abbildung 4.12 Korrelation MDSCs und TH17-Zellen.....	67
---	----

### 9.2 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1 FIGO- und TNM-Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms (Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. 2012).....	5
---	---

Tabelle 1.2. 5-Jahres Überlebensrate beim Ovarialkarzinom .....	7
---	---

Tabelle 2.1 Patientenkollektiv (n=20).....	30
--	----

Tabelle 4.1 Korrelation TH17-Zellen und IFN $\gamma$ Expression in CD4+ und CD8+ T-Zellen.	59
--	----

### 9.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

+	positiv
-	negativ
Arg1	Arginase1
APC	Antigen presenting Cell
BSA	Bovine Serum Albumin
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester
CRC	Kolorektales Karzinom
CSF	colony-stimulating factor
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
EDTA	Ethylendiamine-tetraaceticacid
CTLA4	cytotoxic-leucozyte-antigen-4
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fix/Perm	Fixation/Permeabilization
FoxP3	forkhead box P3 transcription factor
FSC	forward scatter
g	Gewichtskraft
HCC	hepatozelluläres-Karzinom
HIF	hypoxia-inducible-factor
IgG	Immunglobulin Gamma
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogenkarbonat



## Anhang

KS	Kühlschrank
IL	Interleukin
MACS	Magnetische Zellseparation
MDC	Myeloid-derived cell
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute(n)
ml	Mililiter
MNC	mono nuclear cells
Mo	Monate
MP	MACS-Puffer
NF	nuclear factor
NH <sub>4</sub> Cl	Amoniumchlorid
NSCLC	Non-Small-Cell-Lung-Cancer
ns	nicht signifikant
NO	Stickstoffmonoxid
NOS2	Nitrit-Oxid-Synthase 2
PARP	Peroxisome-Proliferator-activated Receptors
PB	peripheres Blut
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphat-buffered saline
PC	peritoneal cells
PG	Prostaglandin
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
R	Korrelationskoeffizient
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
ROR <sub>γ</sub> t	retinoic acid receptor related orphan receptor
rpm	revolutions per minute
RFS	Relapse Free Survival
RT	Raumtemperatur
SNP	single nucleotide polymorphisms
SSC	side scatter
STAT	signal transducers and activators of transcription
TAM	tumor assoziierte Makrophagen
TGF-β	transforming growth factor beta
Th17 Zelle	T-helper 17 Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
VEGF	vascular endothelial growth factor

#### **9.4 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER**

Meine akademischen Lehrer und Dozenten an der Universität Marburg waren die Damen und Herren Prof./PD/Dr.

Aumüller, Barth, Bartsch, Baum, Baumann, Becker, Bien, Bolm, Cordes, Czubayko, Daut, Decher, Donner-Banzhoff, Efe, Eikmann, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Fischer, Fritz, Gress, Grosse, Hertl, Horn, Hoyer, Kann, Kircher, Koolman, Klose, Koehler, König, Kruse, Kubo, Lauth, Lill, Lohoff, Neubauer, Maier, Meier, Michl, Moll, Müller, Mueller, Mutters, Oertel, Oliver, Opitz, Plant, Preisig-Müller, del Rey, Richter, Rinné, Röhm, Rominger, Rosenow, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Schütz, Secundo, Sevinc, Sommer, Steininger, Suske, Tackenberg, Thursar, Vogelmeier, Volchkov, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulff und Zemlin.

In Badajoz (Spanien): Leal, Miranda, Rebollo, Sabugal, Solano

### 9.5 DANKSAGUNG

Während des gesamten Prozesses der Doktorarbeit habe ich von vielen Menschen Unterstützung erfahren, denen ich an dieser Stelle ausdrücklich danken möchte.

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Uwe Wagner für die Bereitstellung des produktiven Arbeitsumfeldes im Zellkulturlabor der Klinik für Gynäkologie, gynäkologische Endokrinologie und Onkologie.

Darüber hinaus gilt ein ganz besonderer Dank meiner Betreuerin, Frau Dr. Silke Reinartz, die mir von meinen ersten Schritten im Labor bis zur Abgabe der Dissertation stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Durch ihre Motivation und die stets konstruktive Kritik habe ich nie am Gelingen dieser Arbeit gezweifelt.

Während der praktischen Arbeit war für mich zudem das Mitarbeiterteam im Labor verlässlicher Ansprechpartner, wofür ich mich stellvertretend insbesondere bei Frau Traute Plaum und Herrn Achim Allmeroth bedanken möchte.

Die gesamte Dissertation wäre nicht ohne den Rückhalt aus Familie und Freunden möglich gewesen. Denn die Unterstützung, die ich während des Studiums durch meine Eltern erfuhr, hat dieses große Projekt für mich überhaupt erst realisierbar gemacht.